



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA IN BIOINGEGNERIA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**MODELLO OTTIMO DELLA RISPOSTA
EMODINAMICA CEREBRALE
NELLO STUDIO DELLA “FATICA CENTRALE” IN
fMRI**

Relatore: Prof.ssa Alessandra Bertoldo

Correlatori: Dott.ssa Emanuela Formaggio

Dott.ssa Silvia Francesca Storti

Dott. Paolo Manganotti

Laureanda: Deborah Moretto

Padova, 12 Luglio 2011

Anno Accademico 2010/2011

*Tutti dicono che il cervello sia l'organo
più complesso del corpo umano,
da medico potrei anche acconsentire.
Ma come donna vi assicuro che
non vi è niente di più complesso del cuore,
ancora oggi non si conoscono i suoi meccanismi.
Nei ragionamenti del cervello c'è logica,
nei ragionamenti del cuore ci sono le emozioni.*

(Rita Levi Montalcini)

Alla mia famiglia:

papà, mamma e Sabrina.

A Luca, il mio Amore.

INDICE

INDICE	7
INTRODUZIONE.....	9
CAPITOLO 1	11
RISONANZA MAGNETICA FUNZIONALE.....	11
1.1 RISONANZA MAGNETICA FUNZIONALE, EFFETTO BOLD.....	11
1.1.1 L'EFFETTO BOLD	13
1.2 STUDIO DELLA FATICA CENTRALE TRAMITE fMRI.....	17
CAPITOLO 2	23
RISPOSTA EMODINAMICA E GENERAL LINEAR MODEL.....	23
2.1 STATO DELL'ARTE.....	23
2.2 GENERAL LINEAR MODEL	30
2.3 INDIVIDUAL BASED HRF	37
CAPITOLO 3	41
DATA SET	41
3.1 ACQUISIZIONE DEI DATI	41
3.2 DATA-SET e PROTOCOLLO SPERIMENTALE	42
3.4 PRE-PROCESSING.....	45
CAPITOLO 4	51
GENERAZIONE DI MAPPE DI ATTIVAZIONE	51
4.1 PRE-PROCESSING.....	51
4.2 IMPLEMENTAZIONE ED APPLICAZIONE HRF FISSE.....	54
4.2.1 ANALISI DI PRIMO LIVELLO (GLM).....	54
4.2.2 STIMA E RISULTATI.....	56
4.3 IMPLEMENTAZIONE ED APPLICAZIONE DELL'HRF INDIVIDUAL-BASED.....	57
4.4 INDIVIDUAZIONE DELLE REGIONI D'INTERESSE	60
4.5 UTILIZZO DELL'INDICE DI AKAIKE PER SCELTA DELL'HRF OTTIMA	61
4.6 ANALISI DI GRUPPO.....	63
CAPITOLO 5	65

RISULTATI	65
5.1 CONFRONTO TRA RISPOSTE EMODINAMICHE STANDARD NELLE MAPPE DI ATTIVAZIONE	65
5.2 GENERAZIONE DELLA ibHRF PER OGNI SOGGETTO	71
5.3 UTILIZZO DELL'INDICE DI AKAIKE PER LA SCELTA DEL MODELLO OTTIMO DELLA RISPOSTA EMODINAMICA	76
5.3.1 CONFRONTO TRA MOVIMENTO MASSIMO, MINIMO E MASSIMO POST-SFORZO	83
5.4 ANALISI DELLE AREE DI ATTIVAZIONE	83
5.5 ANALISI DI GRUPPO	90
CAPITOLO 6	93
CONCLUSIONI	93
Bibliografia e Sitografia	97

INTRODUZIONE

La risonanza magnetica funzionale è una delle più recenti tecniche di neuroimaging funzionale e sfrutta le variazioni emodinamiche prodotte dall'attività neuronale per identificare le aree cerebrali d'attivazione. Essendo una tecnica non invasiva è applicata in ambito clinico per lo studio dell'attività cerebrale in soggetti affetti da neuropatologie. L'fMRI è anche utilizzata per lo studio della fatica centrale, la quale è correlata a numerosi disturbi neurologici quali: disfunzioni cerebrovascolari, sclerosi multipla, narcolessia e disturbi del sonno, morbo di Parkinson, traumi cranici, disfunzioni dei moto neuroni, fatica cronica.

Questa tesi nasce grazie alla collaborazione con il reparto di Neurologia del Policlinico Universitario Borgo Roma di Verona.

Il progetto consiste nella selezione del modello ottimo della risposta emodinamica cerebrale (hrf) in riferimento allo studio della fatica centrale durante l'esecuzione di un task motorio della mano: movimento massimo, minimo e massimo post-sforzo. Lo scopo principale è quello di valutare le differenze in termini di mappe d'attivazione cerebrale ed indice di Akaike tra alcuni modelli standard e un modello individual-based (ibHRF), opportunamente costruito a partire dai dati di ogni singolo soggetto. Inoltre, per quantificare l'influenza della fatica centrale nelle mappe di attivazione, è stato effettuato il confronto tra i movimenti massimo e massimo post-sforzo.

Questo studio si basa sull'elaborazione di immagini fMRI 3T di nove soggetti sani, acquisite presso l'ospedale Maggiore di Borgo Trento di Verona. Per ciascun soggetto sono state acquisite quattro sessioni: una risonanza anatomica e tre funzionali, una per ogni tipo di task motorio.

Nel primo capitolo saranno presentati i principi teorici dell'fMRI e della fatica centrale. Verranno poi descritti i tipi di modelli della risposta emodinamica cerebrali noti in letteratura, i filtri e le trasformazioni applicati alle immagini di risonanza magnetica al fine di uniformarle e minimizzare gli artefatti e gli errori dovuti all'acquisizione. In seguito verrà descritto il General Linear Model utilizzato per la costruzione del modello emodinamico al variare delle hrf

standard utilizzate: canonical hrf, canonical hrf + derivata temporale e canonical hrf + derivate temporale e dispersiva. Il modello è il fondamento su cui si basa la stima dei parametri beta utilizzati nell'analisi statistica per la definizione delle mappe d'attivazione cerebrale.

Verrà quindi descritta la costruzione dell'ibHRF e verranno presentati i risultati ottenuti in termini sia fisiologici che metodologici. Poiché è noto che la risposta emodinamica varia a seconda del soggetto e dell'area cerebrale da analizzare, l'applicazione dell'ibHRF permette di descrivere queste variazioni.

Attraverso il calcolo dell'indice di Akaike per ciascun modello si procederà alla scelta del modello emodinamico ottimo e alla valutazione dell'influenza della fatica centrale sui risultati ottenuti per i soggetti sani.

Attraverso questo studio è stato possibile fornire un'ulteriore dominio di validità dell'hrf individual-based, metodo precedentemente validato su dati simulati. Attraverso la quantificazione e la valutazione dell'attivazione cerebrale è stato possibile evidenziare l'insorgenza della fatica centrale durante un semplice task motorio (quale il movimento massimo post-sforzo) in soggetti sani e non solo in pazienti neuropatologici.

CAPITOLO 1

RISONANZA MAGNETICA FUNZIONALE

La scoperta del fenomeno della Risonanza Magnetica Nucleare, dovuta a Bloch e Purcell nel 1946, fornì un potente strumento alla chimica analitica tanto che nei venti anni successivi si sviluppò una raffinata metodica spettroscopica per l'analisi non distruttiva di piccoli campioni di materia. Fu solo negli anni '70 che si cominciò a pensare alla Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) come processo utile per l'imaging medico e negli anni '80 iniziò la diffusione in ambito clinico della nuova metodica di immagine, denominata Magnetic Resonance Imaging (MRI). Nei primi anni '90 è iniziato lo studio di metodi per la generazione di immagini funzionali mediante MR, che ha prodotto una nuova metodica denominata functional MRI (fMRI). L'osservazione che dà origine alla fMRI è che l'emodinamica locale cerebrale riflette l'attività neuronale.^[1]

1.1 RISONANZA MAGNETICA FUNZIONALE, EFFETTO BOLD

La risonanza magnetica funzionale è una delle tecniche di neuroimaging più recenti e fornisce informazioni relative alla funzionalità di un organo. La fMRI viene generalmente utilizzata come sinonimo di risonanza magnetica funzionale neuronale. Questa tecnica sfrutta le variazioni emodinamiche prodotte dall'attività neuronale per identificare le aree del cervello umano che si attivano durante una determinata condizione. Il cervello, come ogni altro organo del corpo umano, richiede una dose maggiore di ossigeno quando ha la necessità di metabolizzare il glucosio per ricavarne energia. Da studi svolti fin dai primi anni del '900 è noto che cambiamenti dell'attività cellulare neurale del cervello sono associati a cambiamenti delle richieste energetiche. La fMRI applicata all'encefalo, grazie alla possibilità di acquisire immagini in tempi molto ridotti

(dell'ordine del centesimo di secondo), permette di visualizzare in modo molto preciso e dettagliato le variazioni emodinamiche delle regioni corticali, in relazione con il livello di attività neuronale nelle regioni stesse. Quando i neuroni sono attivi, consumano l'ossigeno trasportato dall'emoglobina degli eritrociti che attraversano i capillari sanguigni: si ha quindi, oltre alla variazione del flusso sanguigno cerebrale, anche variazioni locali del volume ematico cerebrale (CBV) e della concentrazione relativa di deossiemoglobina (dHB) ed ossiemoglobina (Hb). In questo modo si sfruttano quindi le proprietà magnetiche di cui gode l'emoglobina a seconda del suo livello di ossigenazione per registrare immagini che si ipotizza rispecchino le variazioni dell'attività neuronale locale. La fMRI, rispetto alle altre tecniche di imaging funzionali (quali PET, SPECT, NIRS e Magnetic Particle Imaging (MPI)), è facile da usare per lo sperimentatore e presenta una scarsa risoluzione temporale (2-4 s), un'ottima risoluzione spaziale (2-6 mm) e non necessita dell'uso di traccianti in quanto si basa sulla misurazione di un segnale intrinseco. La fMRI è l'ultima di una lunga serie di innovazioni, tra cui la tomografia ad emissione di positroni (o PET dall'inglese Positron Emission Tomography) e la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS Near-infrared Spectroscopy), che utilizzano il flusso di sangue e il metabolismo di ossigeno per dedurre l'attività cerebrale. Rispetto alla PET, il segnale misurato dalla fMRI è più debole ed anche il SNR è peggiore ma, essendo la fMRI non invasiva, è possibile acquisire più serie di immagini senza rischi per il paziente. Per migliorare il SNR si dovrebbe aumentare la dimensione del voxel e quindi andare a ridurre la risoluzione spaziale. Un aumento delle dimensioni del voxel causerebbe però una maggior presenza di effetti di volume parziale ossia un voxel non rappresenta un solo tessuto.^[2] La NIRS è anch'essa una tecnica non invasiva ma rispetto alla fMRI presenta una buona risoluzione temporale (0.1 s), una scarsa risoluzione spaziale (2-3 cm) e permette di registrare variazioni presenti sulla sola superficie del cervello. Inoltre la NIRS non permette di ottenere direttamente informazioni relative l'anatomia cerebrale portando quindi ad una localizzazione spesso inaccurata dell'attivazione neuronale.^[3]

La scoperta dell'effetto BOLD (dall'inglese Blood Oxygenation Level Dependent), principio scoperto da Seiji Ogawa nei laboratori Bell (USA) alla fine degli anni 80, ha portato alla messa a punto della tecnica BOLD fMRI che permette di mappare l'attività cerebrale funzionale senza l'utilizzo di mezzi di contrasto e con risoluzione spaziale propria della MRI. I primi esperimenti BOLD fMRI sono del 1992. Ad esempio, Kwong et al. (1992) dimostrò che se un soggetto veniva esposto ad un flash con LED per 60 s, ogni 60 s di riposo, i cambiamenti di livello della deossiemoglobina nella corteccia visiva erano tali da produrre variazioni misurabili nelle immagini MRI ottenute con sequenza gradient-echo.^{[4][5]}

1.1.1 L'EFFETTO BOLD

Ogawa et al. (1990) e Turner et al. (1991) dimostrarono, in esperimenti condotti su animali da laboratorio con campi magnetici $B_0 \geq 1.5T$ e immagini pesate T_2^* , che un simile cambiamento nel contrasto delle immagini MR riguardanti aree circostanti i vasi sanguigni poteva essere ottenuto più semplicemente inducendo un cambiamento nello stato di ossigenazione del sangue.^{[4][6]} Questa osservazione derivava dal fatto notato da Faraday e misurato sperimentalmente da Pauling e Coryell (1936) che la dHb è paramagnetica mentre l'Hb (la quale ha una suscettività magnetica quasi uguale a quella del tessuto) è diamagnetica, perciò la dHb può essere considerata come un agente di contrasto naturale.^[7]

Variazioni nell'attività cerebrale di un soggetto che creano uno sbilanciamento tra la sottrazione di ossigeno ed il flusso sanguigno producono un cambiamento nel segnale MRI attorno ai vasi che irrorano la corteccia, questo fenomeno può essere osservato nel caso in cui vengano usate sequenze di immagini MR sensibili alle disomogeneità del campo magnetico. Il segnale MR microvascolare nelle immagini pesate T_2 (rilassamento spin-spin) e T_2^* (1.1) è fortemente influenzato dallo stato di ossigenazione del sangue. Il tasso di perdita di coerenza di fase degli spin dei protoni è una misura di T_2 e dell'omogeneità locale del campo magnetico (T_2^*). La costante di tempo reale T_2^* è data da:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma \Delta B_0}{2} \quad (1.1)$$

in cui T_2 è il rilassamento spin-spin, ΔB_0 è la massima disomogeneità del campo magnetico B_0 e γ è il rapporto giromagnetico.

La tecnica BOLD non misura direttamente la perfusione tissutale o la portata. Poiché oltre il 70% del sangue del cervello si trova all'interno dei capillari microvascolari e delle venule, la misura della suscettibilità magnetica, che induce una riduzione del segnale T_2^* , si pensa rifletta lo stato di deossigenazione locale del sistema venoso. Inoltre, la perfusione e la diffusione dei protoni attraverso la variazione di gradienti locali ha un impatto diretto sui tempi di rilassamento T_2 osservati, che è un altro meccanismo di generazione del contrasto tissutale.

La presenza di qualsiasi sostanza in un campo magnetico altera il campo in qualche misura. Alcuni elementi in metallo hanno un elevato momento magnetico intrinseco relativo all'acqua o all'aria, e subiscono un'elevata polarizzazione se posti in un campo magnetico. Il grado di questo effetto è denominato "suscettibilità magnetica". Il ferro nell'emoglobina del sangue (Fig. 1.1) è un agente di contrasto intravascolare che si trova in ogni tessuto ed è inerente alla suscettibilità magnetica poiché induce una riduzione del T_2^* . Quindi è usato come indicatore locale dell'attivazione funzionale, perché il sangue arterioso ossigenato contiene emoglobina ossigenata, che è diamagnetica ed ha un piccolo effetto di suscettibilità magnetica. Tuttavia non altera significativamente il campo magnetico locale e non influenza pesantemente il T_2^* del tessuto.

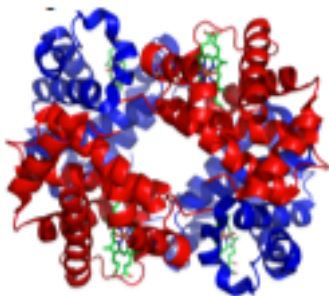


Figura 1.1: Struttura dell'emoglobina. I gruppi eme contenenti il ferro sono in verde (TorinoScienza).

La deossigenazione dell'emoglobina produce dHb, una specie molto più paramagnetica del ferro a causa dei quattro elettroni spaiati, che disturba il campo magnetico locale B_0 in una regione di tessuto che induce il grande effetto

osservato di suscettibilità magnetica. Il bilanciamento tra alterazioni spaziali e temporali nella concentrazione locale di ferro deossigenato ed ossigenato modifica il $T2^*$ locale osservato, provocando fluttuazioni della suscettibilità magnetica. Il sangue arterioso trasportato presenta principalmente ossiemoglobina, tuttavia, quando l'Hb passa attraverso il letto capillare, la concentrazione locale di dHb aumenta e spesso è predominante.

Il contrasto in fMRI è quindi determinato dal bilanciamento dell'emoglobina ossigenata e deossigenata nel sangue all'interno di un voxel, che a sua volta è una funzione dell'autoregolazione locale arteriosa o della vasodilatazione (Fig.1.2).

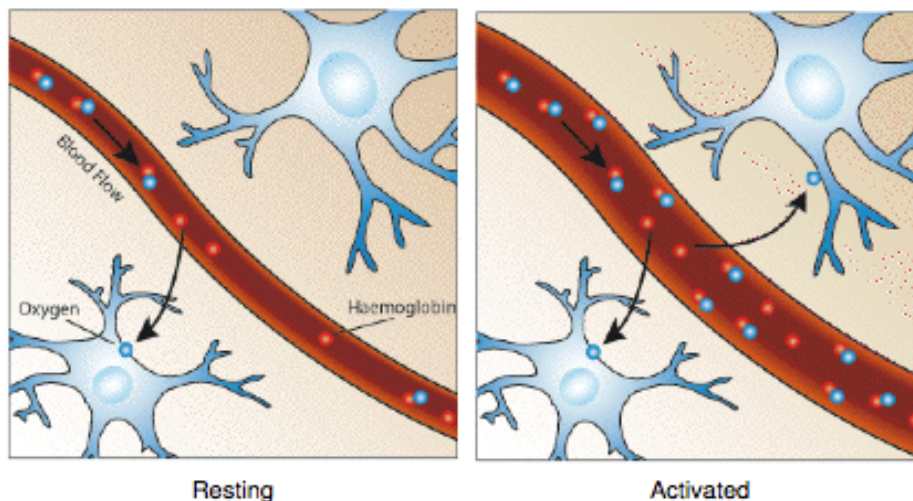


Figura 1.2: Dopo l'attivazione, l'ossigeno viene estratto dalle cellule, aumentando così il livello di deossiemoglobina nel sangue. Ciò è compensato da un aumento del flusso ematico nelle vicinanze delle cellule attive, portando ad un aumento netto ossiemoglobina.^[2]

Aumentando il flusso di sangue ossigenato o riducendo l'estrazione di ossigeno a una regione del cervello, si ha un aumento locale intravoxel di $T2^*$ che, a sua volta, induce un aumento d'intensità nelle immagini. Va ricordato che l'aumento dell'intensità locale dell'immagine dipenderà anche dalle differenze nell'emodinamica (volume del sangue, flusso ed ossigenazione) e nella struttura dei vasi (raggio, orientamento, apertura vascolare).

Durante la stimolazione in MR, si osserva che il $T2^*$ è influenzato dal rapporto tra Hb e la paramagnetica dHb presenti nel letto capillare e venoso. Questo

equilibrio produce un gradiente nel campo magnetico locale e un potente meccanismo di contrasto dei tessuti, perché la grande superficie del letto capillare amplifica gli effetti a lungo raggio sul campo magnetico. La stimolazione produce una rapida attivazione neuronale, che a sua volta aumenta il flusso ematico cerebrale (CBF), il volume ematico cerebrale e l'apporto di ossigeno. Quando il CBF aumenta più del CBV, l'apporto di ossigeno aumenta superando il bisogno locale di ossigeno dovuto all'attivazione. Il rapido aumento del CBF locale nelle arteriole e nelle piccole arterie si dice che sia disaccoppiato dal metabolismo locale.^[8] L'effetto netto è un surplus della quantità di emoglobina ossigenata trasportata in ogni voxel attivato. Non appena l'ossigeno fornito supera il fabbisogno locale, i letti capillare e venoso si riempiono con un apporto maggiore di emoglobina ossigenata che non deossigenata rispetto a quando la corteccia è a riposo (Fig. 1.3).^[9]

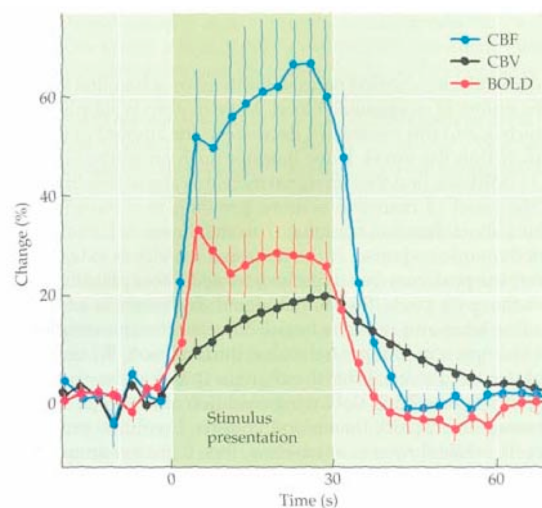


Figura 1.3: Andamento del segnale BOLD (rosso) nel tempo durante una sequenza riposo-stimolo; in blu è rappresentata la perfusione cerebrale (CBF) e in nero il volume ematico (CBV).^[10]

Il segnale BOLD presenta un *poststimulus undershoot* che è legato ai cambiamenti di CBF e CBV che avvengono in risposta all'attivazione neuronale. Alla fine dell'attivazione, il CBF diminuisce molto più rapidamente del CBV portando ad una maggiore concentrazione di dHb rispetto alla situazione basale. Di conseguenza anche il segnale BOLD è al di sotto della *baseline*.

1.2 STUDIO DELLA FATICA CENTRALE TRAMITE fMRI

La fatica è una condizione che si presenta in tutti gli individui ma assume un aspetto importante soprattutto in soggetti affetti da alcune patologie. Nonostante non vi sia una definizione standardizzata del concetto di fatica, è noto dalla letteratura che viene classificata in due modi in base alle cause che la inducono: fatica centrale e periferica. La fatica è espressione di due processi principali, costituiti dalla trasmissione del segnale nervoso e dalla catena energetica metabolica, integrati tra loro e che portano all'insorgere della fatica. In questo lavoro andremo a valutare solo l'influenza della fatica centrale sull'attivazione cerebrale, tralasciando gli aspetti relativi alla fatica periferica.

La fatica centrale (o nervosa) è definita come l'insieme dei fattori che determinano una diminuzione della contrattilità muscolare indipendentemente da fattori metabolici o intramuscolari.^[11] In uno stato di affaticamento, il Sistema Nervoso Centrale non riesce a generare uno stimolo adeguato a causa dell'insorgenza della fatica centrale che non permette di raggiungere il livello di forza massimale. La riduzione della capacità contrattile delle fibre muscolari è anche legata a fattori metabolici periferici anche se il ruolo del comando nervoso centrale è spesso predominante. Alcuni aspetti della fatica centrale non sono completamente conosciuti ma si è propensi ad affermare che la sua insorgenza è dovuta ad un fenomeno inibitorio che si verifica a causa di meccanismi che agiscono a livello globale sull'insieme delle funzioni nervose.^[12] Il meccanismo della fatica centrale è definito da: una diminuzione del reclutamento delle unità motorie che presentano una soglia alta allo stimolo; una riduzione del controllo centrale dovuto all'inibizione crescente dell'input trasmesso dagli interneuroni alla corteccia motoria; un arresto della conduzione centrale dovuta a demielinizzazione o alla disattivazione dei motoneuroni; un aumento del feedback negativo dai muscoli afferenti ai neuroni sensoriali; un decremento del feedback positivo dai fusi muscoli agli afferenti sensoriali.^[13]

Si ritiene che il ruolo dei neuromediatori centrali sia collegato alla presenza della fatica centrale. Gli aspetti neurochimici della fatica nervosa riguardano in particolare la secrezione di catecolamine, noradrenalina, dopamina, tirosina, ed

altre sostanze endocrine. Il cervello svolge quindi il ruolo di regolatore dell'atto motorio al fine di prevenire danni all'organismo ed un eccessivo accumulo di metaboliti.

La fatica è quindi il risultato di un comando di tipo inibitorio da parte del sistema nervoso centrale: la diminuzione dei comandi neurali è causata da adattamenti a livello corticale che si verificano a seguito di modificazioni delle risposte metaboliche provenienti dall'organismo. La fatica diviene un regolatore attivo dell'attivazione neuronale.

L'MRI del cervello è una tecnica utilizzata per lo studio della fatica centrale, la quale è correlata a numerosi disturbi neurologici quali: disfunzioni cerebrovascolari, sclerosi multipla, narcolessia e disturbi del sonno, morbo di Parkinson, traumi cranici, disfunzioni dei moto neuroni, fatica cronica. Il neuroimaging è infatti applicato principalmente per escludere lesioni strutturali e demielinizzanti. I metodi attuali di ricerca includono la spettroscopia di risonanza magnetica protonica e di neuroimaging funzionale del cervello (fMRI).^[14]

Ad esempio, la fMRI in soggetti affaticati, affetti da sclerosi multipla (SM), presenta un'interazione compromessa tra le aree corticali e subcorticali funzionalmente correlate, evidenziando una correlazione inversa tra il livello di severità della fatica e l'attivazione relativa del talamo ipsilaterale durante semplici compiti motori (movimento delle mani).^[15]

In uno studio effettuato da White et al. (2008), sempre su pazienti con SM e soggetti sani, si è evidenziato che prima del protocollo a fatica i soggetti con SM presentano una migliore attivazione della corteccia motoria primaria contro laterale al movimento, dell'insula e del giro del cingolo, rispetto ai soggetti sani. I risultati indicano che prima dell'esercizio a fatica, i pazienti con SM presentano maggior attivazione cerebrale rispetto ai controlli, che possono essere dovuti a cambiamenti funzionali adattativi in risposta alla demielinizzazione (Fig. 1.4). Tale aumento dell'attivazione può suggerire che i pazienti richiedono un maggiore sforzo per eseguire compiti motori anche semplici. Quando si è

stanchi aumenta la contrazione muscolare ma l'attivazione cerebrale non può essere ulteriormente aumentata.^[16]

La spettroscopia a risonanza magnetica protonica è usata per studiare la funzione metabolica del cervello in vivo. Un ipometabolismo neuronale e un danno assonale sono la prima manifestazione clinica della SM e sono quasi completamente indipendenti dal processo infiammatorio.^[16]

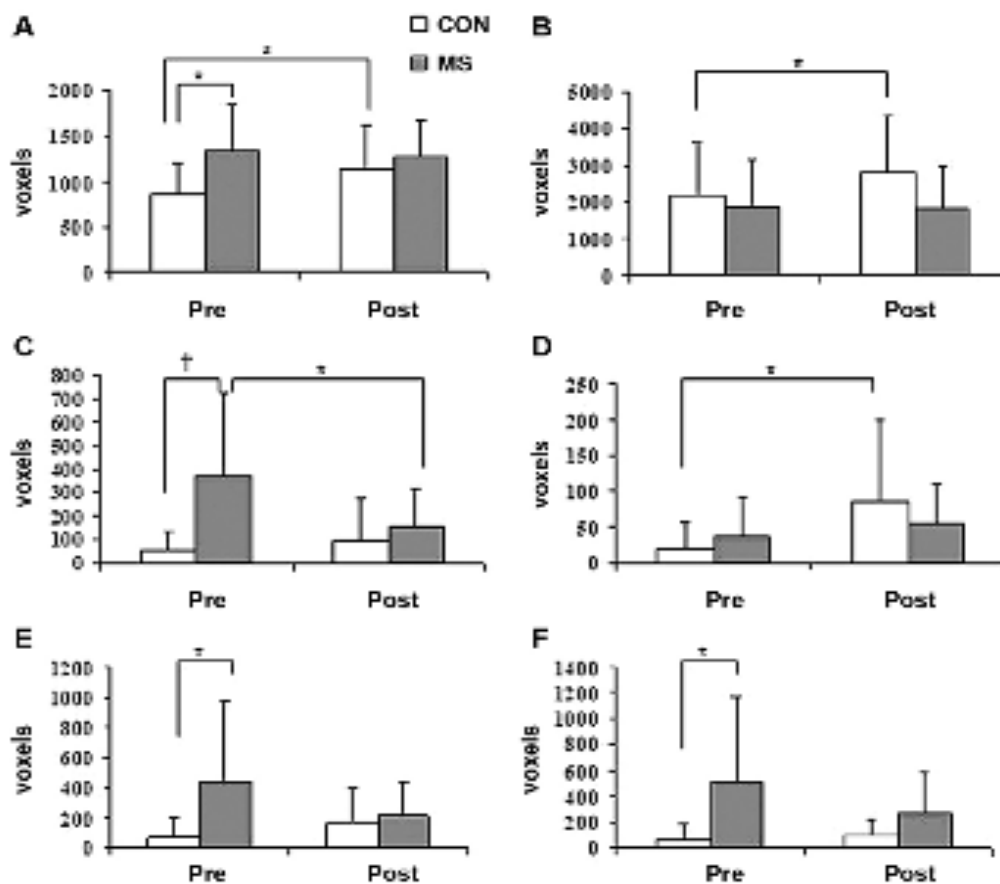


Figura 1.4: Aree medie di attivazione per pazienti con sclerosi multipla (grigio) e controlli (bianco) prima e dopo l'esercizio di fatica: giro precentrale sinistro (pannello A), cervelletto destro (pannello B), insula sinistra (pannello C), insula destra (pannello D), giro del cingolato sinistro (E pannello), giro del cingolato destro (pannello F).^[16]

Inoltre l'ipometabolismo globale del cervello sembra essere un buon indicatore per le ricadute nella SM.^[17] Una combinazione tra affaticamento muscolare e fatica centrale si vede in diversi disturbi, ad esempio, nel morbo di Addison, nella fatica di soggetti post-poliomeliti e con disfunzioni di motoneuroni. Nel morbo di Addison, la fatica dovuta all'esercizio fisico è legata alla contrattilità muscolare alterata, attribuibile all'instabilità della membrana cellulare dovuta

allo spostamento di elettroliti. Tuttavia, i pazienti percepiscono anche più alti livelli di fatica a causa di un meccanismo centrale.^[18]

In pazienti affetti da neuropatie infiammatorie demielinizzanti periferiche, nei quali i disturbi della malattia sono circoscritti al sistema nervoso periferico, la percezione della fatica centrale è legata al comportamento del sistema sensoriale afferente. I sintomi della fatica centrale confrontabili con la sindrome da fatica cronica sono riscontrati in più dell'80% dei pazienti, molti dei quali presentano una disabilità motoria.^[19] La demielinizzazione segmentata di nervi periferici porta ad un rallentamento ed alla perdita di parte del segnale sensoriale afferente, ma la trasmissione del dolore da parte delle fibre amieliniche tipo C rimane invariata. Questa differenza nelle due trasmissioni porta ad una percezione maggiore dello sforzo perché le sensazioni dolorose associate alle attività motorie sono registrate con anticipo rispetto alle condizioni normali.^[14]

Uno studio fMRI sulla sindrome di fatica cronica durante task motorio immaginato (De Lange F.P., 2004), in 16 pazienti affetti da sindrome della fatica cronica e 16 soggetti sani, ha evidenziato dal punto di vista neurale una riduzione del segnale BOLD dai nuclei caudali. Ciò è coerente con l'ipotesi che i disturbi dello striato costituiscono un meccanismo patogenetico della fatica centrale. I soggetti malati reclutano regioni cerebrali addizionali che supportano il processo visivo per compensare una disfunzione della pianificazione motoria.^[20]

Per quanto riguarda la predisposizione genetica alla fatica centrale, studi sui gemelli suggeriscono che fattori genetici ed ambientali sono importanti. Meccanismi genetici potrebbero operare aumentando la sensibilità ad uno stato di stanchezza in condizioni di stress, altri trigger ambientali (ad esempio, infezioni e vaccinazioni), o entrambi (Fig. 1.5).^[21]

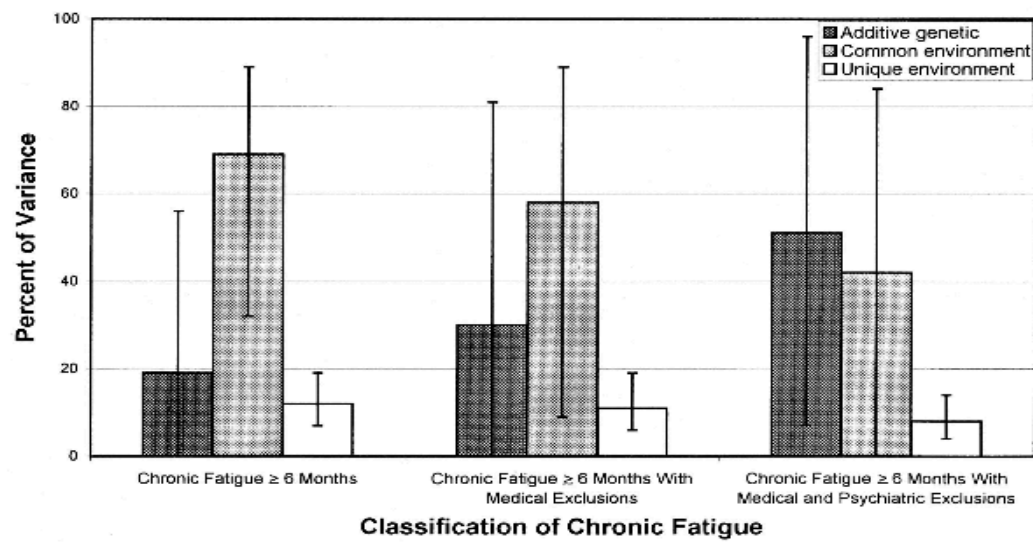


Figura 1.5: Stima dell'influenza genetica ed ambientale sulla predisposizione alla fatica cronica.^[21]

CAPITOLO 2

RISPOSTA EMODINAMICA E GENERAL LINEAR MODEL

L'*hemodynamic response function* (hrf) è la funzione indice dell'emodinamica cerebrale e rappresenta la variazione del segnale misurato dalle bobine dovuto alla variazione dell'attività neuronale. L'hrf è alla base della costruzione del modello utilizzato dal *General Linear Model* (GLM), su cui si basa l'analisi statistica dei nostri dati fMRI. Al variare dell'hrf varia di conseguenza il modello e quindi si possono ottenere mappe d'attivazione cerebrale differenti. Per questo si è scelto di descrivere le principali hrf descritte in letteratura prima di andare ad analizzare nello specifico l'hrf individual-based, generata specificatamente per ogni soggetto.

2.1 STATO DELL'ARTE

La risposta emodinamica non è costante nelle varie regioni cerebrali e non modifica il proprio andamento per stimoli inferiori ad un certo valore (500 ms). La forma della risposta appare simile nelle regioni sensoriali primarie, come la corteccia visiva primaria (V1), la corteccia auditiva primaria (A1) e la corteccia somatosensoriale primaria (S1). Tuttavia la forma dell'*hrf* varia attraverso le aree cerebrali, in particolare nelle regioni corticali superiori poiché la vascolarizzazione è diversificata nelle diverse regioni.^[22] Inoltre la risposta BOLD sembra variare notevolmente tra individui.^[23] Conoscere la forma dell'hrf è importante poiché da essa dipende il modello emodinamico utilizzato nell'analisi dei dati fMRI acquisiti.

Una tipica risposta BOLD ad uno stimolo (Fig. 2.1) è caratterizzata da tre fasi. La prima fase è costituita da un *initial dip*, cioè un tratto di funzione negativa al di

sotto della *baseline* (linea dello zero) che si forma dopo 1-2 s dopo lo stimolo (è osservabile in presenza di elevati campi magnetici). La seconda fase della risposta, detta *peak*, assume il valore massimo della funzione 5-6 s dopo la stimolazione, ed è seguita da un *undershoot* (terza fase) che termina dopo circa 30 s, in cui la risposta emodinamica ritorna negativa raggiungendo il suo valore minimo per poi tornare alla *baseline*.^[24]

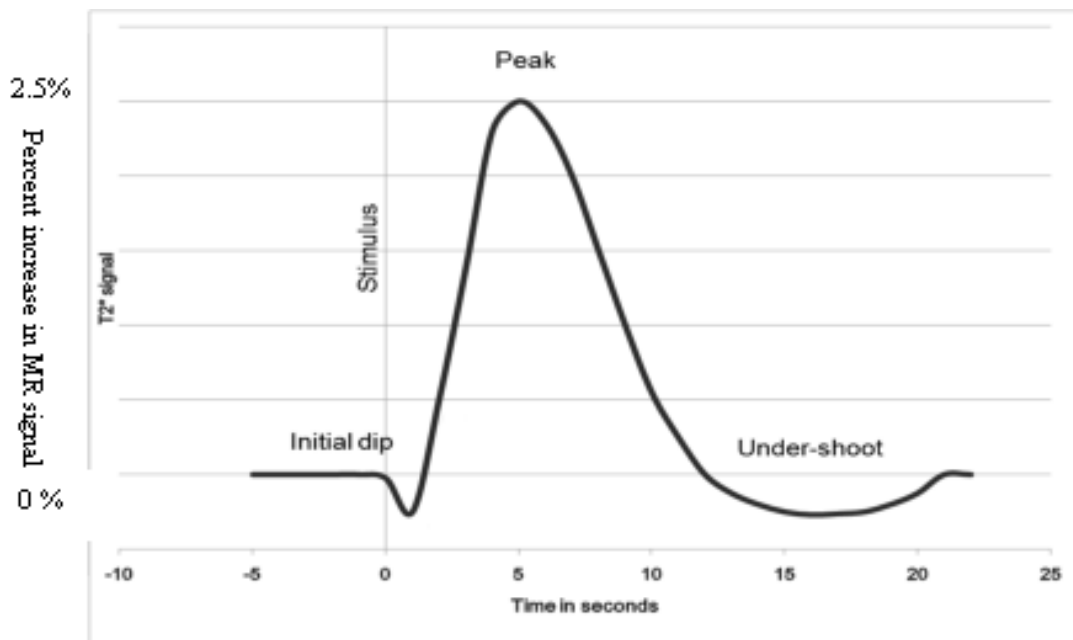


Figura 2.1: Andamento della risposta emodinamica. Si notano: il dip iniziale che avviene circa a 2 s dall'attività neuronale, il picco che si presenta dopo circa 6 s, un undershoot che è presente nella fase finale della risposta emodinamica prima del ritorno al valore di baseline.^[25]

Dalla letteratura sono note varie tipologie di risposta emodinamica, da forme molto semplici a forme più complesse. La più semplice è stata descritta da Boynton et al. nel 1996 e prende il nome di *hrf di Boynton* o *single gamma*. Questa hrf è stata ricavata attraverso lo studio della corteccia visiva in fMRI durante l'applicazione di stimoli visivi. Secondo il modello di Boynton l'attività neurale è una funzione non lineare del contrasto dell'immagine per uno stimolo visivo (dove il contrasto massimo è dato da $(L_{max}-L_{min})/(L_{max}+L_{min})$ in cui L è la luminosità dell'immagine), nonostante la risposta fMRI sia una trasformazione lineare proporzionale all'attività neurale media.^[26] L'hrf è quindi caratterizzata dalla sola fase di picco e la funzione è definita da:

$$h_B = \left(\frac{t-o}{d} \right)^{p-1} \left(\frac{e^{-\frac{(t-o)}{d}}}{d(p-1)!} \right)^{p-1} \quad \text{per } 0 < t < T \quad (2.1)$$

dove t è il tempo in secondi, o è l'*onset* cioè il ritardo iniziale della curva, d è il *time-scaling* e p è un parametro intero che rappresenta il ritardo di fase, *phase-delay*. La funzione è posta a zero per $t < 0$ e $t > T$, dove T è l'ultimo istante temporale preso in considerazione (Fig. 2.2). Boynton et al. hanno dimostrato in uno studio effettuato su immagini fMRI relative alla regione V1 che questa hrf consente un buon fit alla risposta BOLD impulsiva.^[26] Aumentando il valore del parametro p è possibile ottenere un set di *gamma function* con dispersione sempre maggiore.

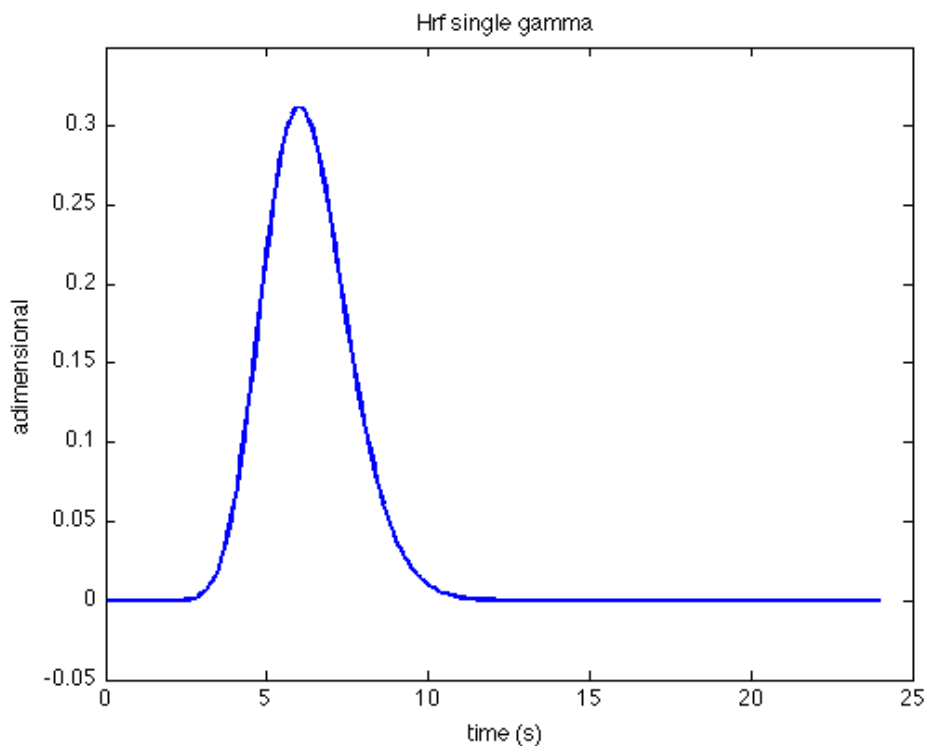


Figura 2.2: Hrf di Boynton calcolata con $p=6$, $d=0$ e $o=3$. Si nota che la funzione presenta solo il picco positivo

Due anni dopo è stata introdotta una nuova risposta emodinamica ottenuta dalla sottrazione di due funzioni gamma: *hrf two-gamma* o *canonical hrf*. Questa nuova funzione, presentata da Friston et al. nel 1998, è data da:

$$h_c(t) = \left(\frac{t}{d_1}\right)^{\alpha_1} e^{-\frac{(t-d_1)}{b_1}} - c \left(\frac{t}{d_2}\right)^{\alpha_2} e^{-\frac{(t-d_2)}{b_2}} \quad \text{per } 0 < t < T \quad (2.2)$$

in cui t è il tempo in secondi, T è l'ultimo istante temporale preso in considerazione, $\alpha_1=6$, $\alpha_2=16$, $\beta_1=\beta_2=1$ e $c=1/6$, e c è dato dal rapporto tra l'ampiezza dell'*undershoot* e l'ampiezza del *peak*.^[27] Al fine di modellare le differenze della latenza della risposta emodinamica attesa, Friston et al. sempre nel 1998, modificarono la canonical hrf traslandola di un tempo τ . La nuova hrf $h_0(t)$ è ottenuta dalla combinazione lineare di due funzioni base: $h(t)$, ossia l'hrf two-gamma, e $h'(t)$, ovvero la derivata temporale di $h(t)$. $h'(t)$ è definita come:

$$h'(t) = \left. \frac{\partial h(t, \tau)}{\partial \tau} \right|_{\tau=0} = -h_0(t) \quad (2.3)$$

dove $h(t, \tau) = h_0(t - \tau)$ se τ è molto piccolo, si può utilizzare lo sviluppo in serie di Taylor arrestato al primo termine attorno a $\tau=0$ per approssimare la risposta emodinamica:

$$h(t, \tau) \approx h_0(t) + h'(t)\tau \quad (2.4)$$

Nel software SPM (Statistical Parametric Mapping)^[28], utilizzato in questa tesi per l'elaborazione dei dati fMRI, sono presenti sia la canonical hrf sia le sue derivate. La derivata temporale della canonical hrf in SPM è ottenuta dalla differenza finita tra una canonical hrf ed una canonical hrf traslata di un secondo e non dall'implementazione della funzione derivativa. Utilizzando anche la derivata temporale, oltre all'hrf two-gamma, è possibile quindi catturare differenze in latenza della risposta emodinamica di circa 1 secondo (codice Matlab contenuto nel file `spm_get_bf.m` del toolbox `spm8`). Per catturare piccole differenze nella durata del picco della risposta emodinamica si introduce la derivata dispersiva della canonical hrf.^[24] Le tre risposte emodinamiche sono rappresentate in Fig. 2.3.

Altre risposte emodinamiche sono state proposte negli ultimi anni al fine di rappresentare in modo migliore la vera risposta emodinamica andandosi ad adattare in modo flessibile alle diverse esigenze degli sperimentatori.

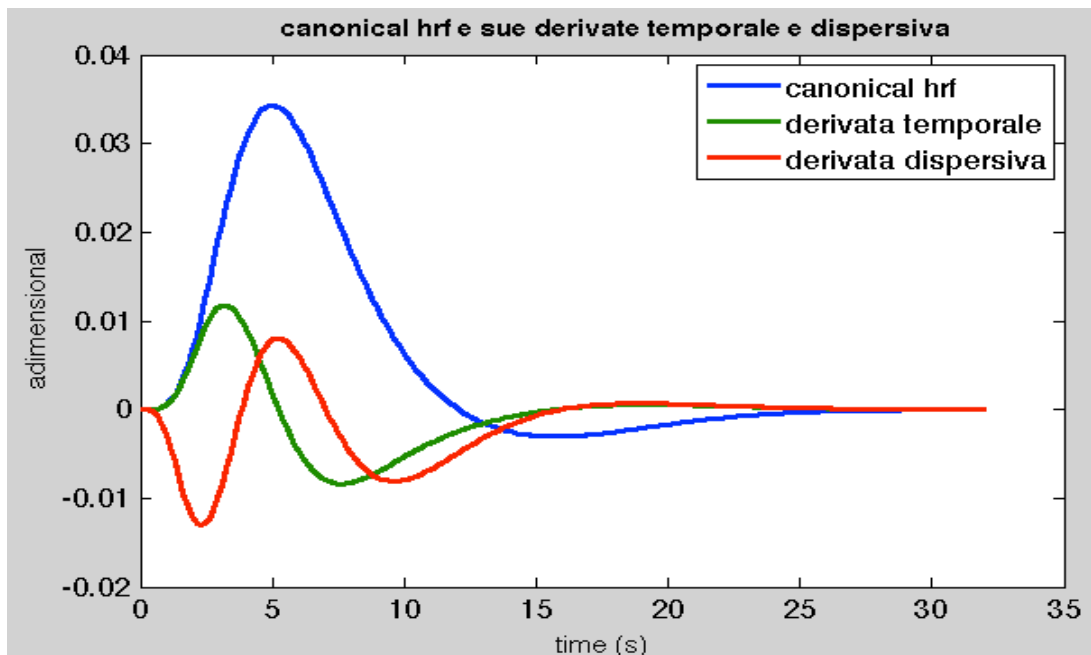


Figura 2.3: Canonical hrf (rosso), e le sue derivate temporale (blu tratteggiato) e dispersiva (verde tratteggiato) in SPM8. La derivata temporale è stata approssimata attraverso la differenza finita di due canonical hrf una con ritardo di picco di 7s e l'altra 6s; la derivata dispersiva è stata approssimata attraverso la differenza finita di due canonical hrf con dispersione di picco di 1 e l'altra di 1.01.

Nel 2003 Handwerker formulò una risposta emodinamica che, come l'HRF canonical in SPM, è costituita dalla somma di due funzioni two-gamma. L'HRF di Handwerker permette di traslare entrambe le curve, positiva e negativa. La formulazione matematica è:

$$y(t) = A_1 \left(\frac{x(t) - \delta_1}{\tau_1} \right)^2 \frac{e^{-\left(\frac{x(t) - \delta_1}{\tau_1} \right)^2}}{\tau_1} + A_2 \left(\frac{x(t) - \delta_2}{\tau_2} \right)^2 \frac{e^{-\left(\frac{x(t) - \delta_2}{\tau_2} \right)^2}}{\tau_2} + C \quad (2.5)$$

dove $x(t)$ è un vettore che rappresenta una generica funzione, A_1 e A_2 modellano la grandezza del picco e dell'*undershoot* rispettivamente, τ_1 e τ_2 modellano l'ampiezza, l'altezza di picco ed il *time-to-peak*, δ_1 e δ_2 modellano il *time-to-onset*, C è un fattore di correzione per riportare la $y(t)$ al valore di *baseline* senza influire sulla forma della funzione (Fig. 2.4).^[29]

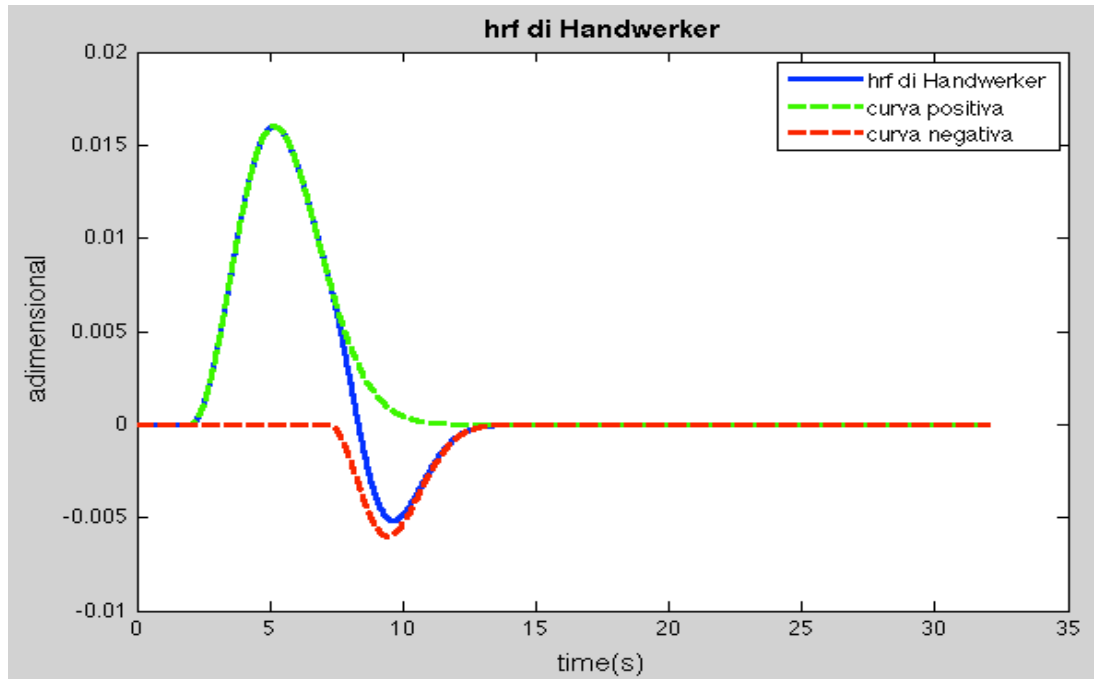


Figura 2.4: HRF di Handwerker. In verde è rappresentata la two-gamma positiva, in rosso la two-gamma negativa che sommandosi danno la HRF di Handwerker in blu. I parametri utilizzati sono: $a_1=0.16$, $a_2=0.03$, $\tau_1=10$, $\tau_2=5$, $\delta_1=2s$, $\delta_2=7.2s$.

Un altro tipo di risposta emodinamica utilizzata in fMRI è la *finite impulse response* (FIR) costituita da un set di funzioni la cui combinazione permette di catturare la forma della risposta BOLD impulsiva reale (*basis sets*). Questo gruppo di funzioni è molto flessibile ed è formato da una serie di funzioni post-stimolo contigue della durata di T/K_{FIR} secondi, dove T è la durata della hrf e K_{FIR} è il numero di funzioni che costituiscono il basis sets (Fig. 2.5).^[24]

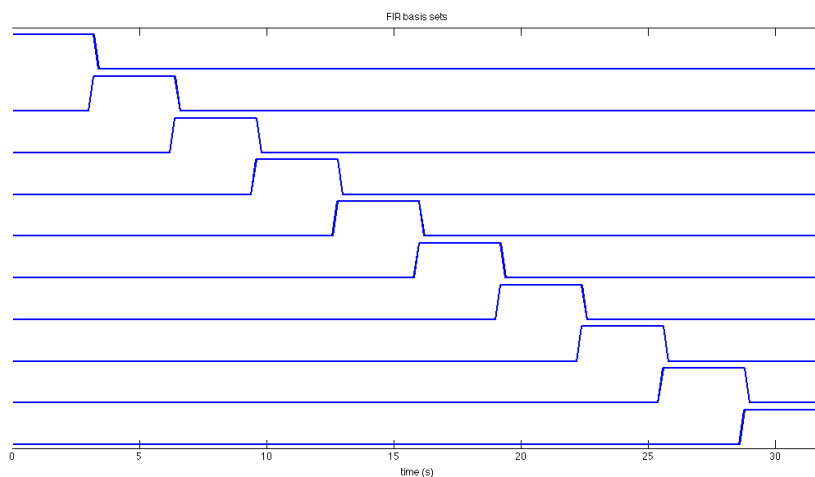


Figura 2.5: Rappresentazione del FIR basis sets con $K_{FIR} = 16$.

Nel caso in cui $T/K_{FIR}=T_R$, le funzioni FIR possono essere considerate un'approssimazione di funzioni delta:

$$h_{FIR} = \sum_{k=1}^K \delta(\tau - k) \quad (2.6)$$

dove h_{FIR} è la risposta emodinamica data dalla somma di K funzioni delta, τ è il tempo tra le diverse scansioni post-stimolo.

Un'altra rappresentazione della risposta emodinamica è data dal Fourier basis sets composto da una funzione costante, K_F funzioni seno e K_F funzioni coseno con periodo $T, T/2, \dots, T/K_F$ s. Come per la FIR anche il Fourier sets sfrutta la combinazione lineare delle funzioni che lo compongono per rappresentare la vera hrf (Fig. 2.6).^[24]

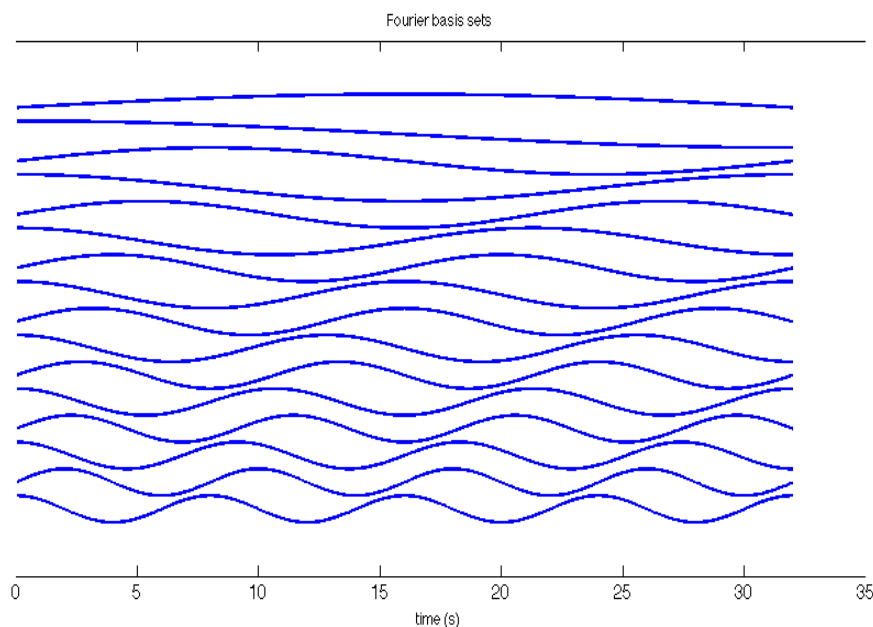


Figura 2.6: Fourier basis sets con $K_F=8$.^[24]

A volte per descrivere l'hrf si utilizzano^[27]: basis sets composti da componenti principali ^[30], funzioni coseno ^[31], serie di funzioni radiali ^[32], spline basis sets, e serie di funzioni spettrali.^[33]

E' importante descrivere correttamente la risposta emodinamica poiché il modello utilizzato nel GLM è strettamente legato alla hrf.

In questo lavoro si utilizzeranno la canonical hrf, la combinazione di questa con le sue derivate temporale e dispersiva ed una hrf specifica per ogni soggetto costruita a partire dalla hrf di Handwerker (ibHRF).

2.2 GENERAL LINEAR MODEL

Per valutare l'attivazione cerebrale a partire dal segnale BOLD è necessario eseguire un'analisi statistica dei dati. In statistica sono presenti vari modelli, i quali si dividono in inferenziali e non inferenziali. I primi richiedono la definizione *a priori* del modello in base al quale varia il segnale mentre i secondi non hanno bisogno di assunzioni iniziali ma si basano su leggi ricavate per l'analisi dei segnali. Il General Linear Model (GLM) sarà utilizzato in questo studio con *SPM8*®.^[34]

Il GLM è un modello matematico lineare usato per descrivere la relazione tra lo stimolo e i dati osservati. Tale modello considera i dati osservati come combinazione lineare di funzioni, che hanno una forma nota ma di cui non si conosce l'ampiezza, più un termine di rumore. Attraverso l'analisi GLM si determinano quindi i valori delle ampiezze delle funzioni che meglio descrivono i dati, attraverso uno stimatore ai minimi quadrati lineari.

Ricordiamo che in fMRI il segnale BOLD in un determinato voxel ed il modello $x(t)$ dipendono fortemente non solo dalla risposta emodinamica ma anche dal disegno sperimentale (Fig. 2.7). La relazione tra lo stimolo e la risposta BOLD è generalmente modellata attraverso un sistema lineare tempo invariante (LTI) in cui il segnale al tempo t , $x(t)$, è dato dalla convoluzione tra lo stimolo esterno $u(t)$ e la risposta emodinamica $h(t)$:

$$x(t) = u(t) \otimes h(t) = \int_0^{\infty} h(\tau) u(t - \tau) d\tau \quad (2.7)$$

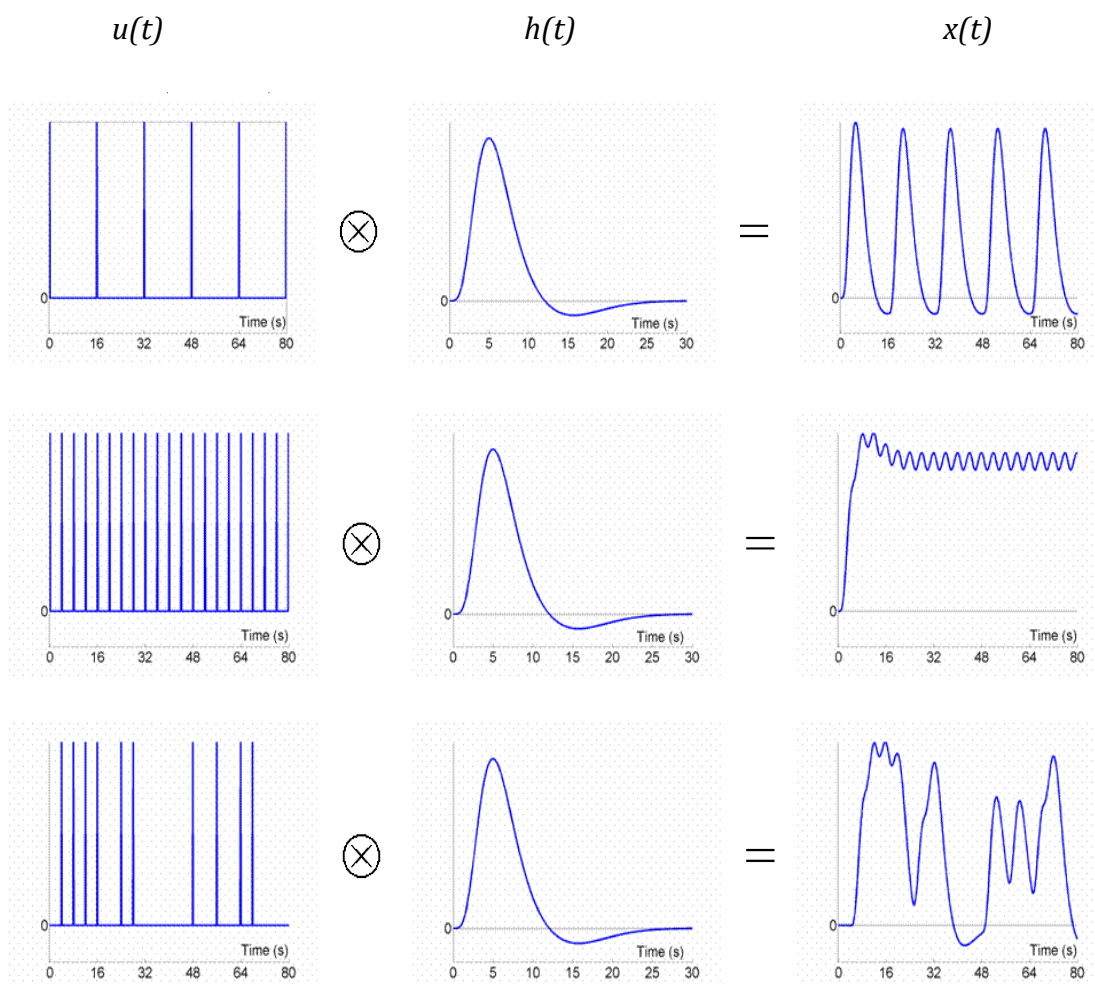


Figura 2.7: Andamento del segnale BOLD $x(t)$ (a destra) al variare del disegno sperimentale $u(t)$ mantenendo costante la forma della risposta emodinamica $h(t)$.^[8]

Il segnale $x(t)$ è poi campionato in N volumi di acquisizione per ogni voxel nei tempi t_j , con $j=1, \dots, N$. Friston et al. proposero nel 1995 una modellizzazione lineare della risposta finale. Dalla combinazione lineare delle variabili esplicative $(x_{ji}\beta_i)$ più un termine di errore (ε_j) si ottiene il segnale fMRI osservato, Y_j :

$$Y_j = x_{j1}\beta_1 + \dots + x_{jM}\beta_M + \varepsilon_j \quad (2.8)$$

dove x_{ji} , con $i=1, \dots, M$, sono le M risposte ottenute a seguito di M stimoli diversi o M risposte emodinamiche di un basis set, u_i , e β_i sono parametri incogniti,^[35] l'errore ε_j è assunto additivo, indipendente, gaussiano, a media nulla e varianza σ^2 : $\varepsilon_j \sim N(0, \sigma^2 I)$.^[24]

In forma matriciale:

$$\begin{pmatrix} Y_1 \\ \vdots \\ Y_r \\ \vdots \\ Y_N \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_1(t_1) & \cdots & x_m(t_1) & \cdots & x_M(t_1) \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ x_1(t_r) & \cdots & x_m(t_r) & \cdots & x_M(t_r) \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ x_1(t_N) & \cdots & x_m(t_N) & \cdots & x_M(t_N) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_m \\ \vdots \\ \beta_M \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \varepsilon_1 \\ \vdots \\ \varepsilon_r \\ \vdots \\ \varepsilon_N \end{pmatrix} \quad (2.9)$$

ed in notazione matriciale:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad (2.10)$$

con M pari al numero di stimoli che vengono modellati ed N numero di volumi. La matrice \mathbf{X} è detta *design matrix* ed ogni colonna contiene i valori di uno dei regressori continui valutato all'istante t_j della serie temporale fMRI (Fig. 2.8).

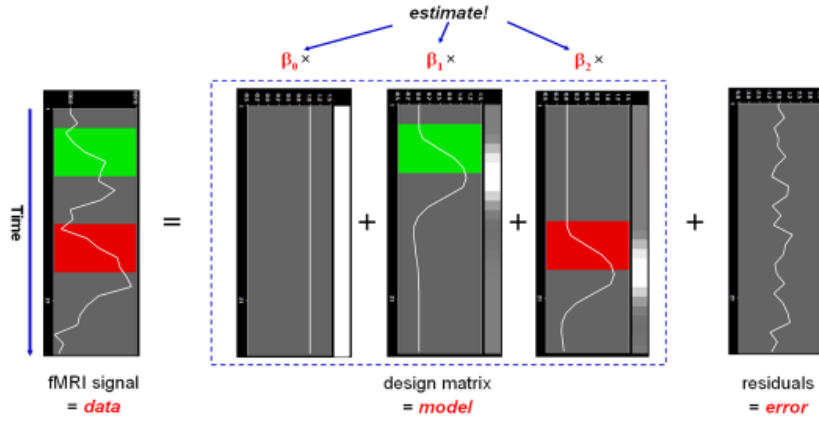


Figura 2.8: Rappresentazione schematica del GLM.^[36]

Essendo \mathbf{X} il modello ed \mathbf{Y} i dati, l'unica incognita è il vettore dei parametri $\boldsymbol{\beta}$. Solitamente la stima ai minimi quadrati del vettore dei parametri, $\hat{\boldsymbol{\beta}}$ è dato da:

$$\hat{\boldsymbol{\beta}} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{Y} = \mathbf{X}^{-1} \mathbf{Y} \quad (2.11)$$

In realtà in fMRI l'errore di misura non può essere considerato come $N(0, \sigma^2 \mathbf{I})$. Il dato fMRI presenta infatti una correlazione seriale di tipo temporale e l'applicazione di un modello auto regressivo è in grado di tener conto delle correlazioni createsi tra intervalli TR successivi. Quindi è più corretto definire l'errore nel seguente modo:

$$\boldsymbol{\varepsilon} \sim N(0, \sigma^2 \mathbf{V}) \quad (2.12)$$

dove \mathbf{V} è la matrice di correlazione e non è diagonale.

Il vettore dei parametri stimati $\hat{\beta}$ va quindi ridefinito come:

$$\hat{\beta} = (\bar{X}^T \bar{X})^{-1} \bar{X}^T \bar{Y} = \bar{X}^{-1} \bar{Y} \quad (2.13)$$

dove

$$\bar{X} = \mathbf{K} \mathbf{W} \mathbf{X} \quad \text{e} \quad \bar{Y} = \mathbf{K} \mathbf{W} \mathbf{Y} \quad (2.14)$$

dove \mathbf{K} è la matrice di filtraggio temporale e \mathbf{W} è la matrice di pesatura definita come: $\mathbf{W} = \mathbf{V}^{-1/2}$. Una volta stimati i parametri, la stima dell'errore di misura sarà data da:

$$\varepsilon = \bar{Y} - \bar{X} \hat{\beta} \quad (2.15)$$

La matrice \mathbf{V} è definita a partire dalle componenti della covarianza che specificano la non sfericità, in particolare la correlazione seriale in fMRI. Queste componenti della covarianza vengono definite attraverso gli iperparametri (λ) stimati con ReML (Restricted Maximum Likelihood) attraverso l'algoritmo presentato da Friston et al. nel 2002, nel quale si utilizza lo schema a punti di Fisher per massimizzare la funzione obiettivo nel ReML.^[24]

Questo stimatore assume che tutti i voxel, anche quelli che eccedono la *global F-threshold*, presentano la stessa non-sfericità. Le stime ottenute con ReML possono poi essere usate per "sbiancare" i dati fMRI attraverso l'utilizzo di stimatori quali Maximum Likelihood (ML) o Gauss_Markov. Per ogni voxel delle immagini è stimato un unico iperparametro. Possiamo definire la matrice \mathbf{V} come funzione degli iperparametri che controllano le componenti della covarianza:

$$\mathbf{V}(\lambda) = \lambda_1 \mathbf{Q}_1 + \dots + \lambda_n \mathbf{Q}_n \quad (2.16)$$

dove \mathbf{Q} rappresenta un certo basis set di modelli per la covarianza e \mathbf{Q}_i descrive la forma delle componenti della covarianza (Fig. 2.9). Le $\mathbf{V}(\lambda)$ vengono stimate con elevata precisione su un gran numero di voxels.

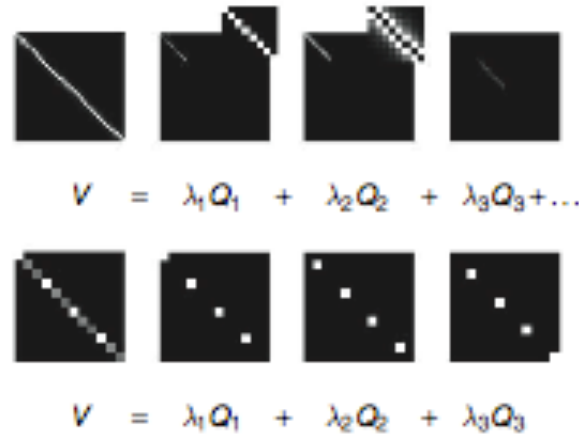


Figura 2.9: Esempio di costruzione delle componenti della matrice di covarianza. In alto è presentato il caso in cui vi siano numerose osservazioni nel tempo per un certo numero di soggetti. In basso il caso in cui vi siano tre misurazioni per ognuno dei soggetti.

In definitiva si fattorizza la covarianza dell'errore in varianza specifica di ogni voxel e correlazione. SPM quindi tratta la matrice V come una quantità nota e non da stimare. Una volta stimati i parametri β_i , si può stimare a posteriori la costante di proporzionalità della varianza dell'errore σ^2 :

$$\sigma^2 = \frac{WRSS}{N - M} \quad \text{dove} \quad WRSS = (\hat{Y} - \hat{X}\hat{\beta})^T V^{-1} (\hat{Y} - \hat{X}\hat{\beta}) = \epsilon^T V^{-1} \epsilon$$

(2.17)

in cui WRSS sono i residui pesati. Infine ricordiamo che la matrice di covarianza dell'errore di stima è data da:

$$\Sigma_{\beta} = \sigma^2 (\hat{X}^{-1} V \hat{X}^{-T})$$

(2.18)

Per passare dalle stime dei parametri alle mappe di attivazione cerebrale è necessario eseguire un *t-test*. Si definisce il vettore di contrasto c , il quale specifica le differenze tra i parametri β stimati. Il vettore c è un vettore della stessa lunghezza di β che contiene valori sia positivi che negativi ed è ortogonale verso gli altri vettori contrasto. Una volta fissato il contrasto e definita l'ipotesi nulla H_0 del *t-test*, posso determinare se il segnale misurato in un certo voxel soddisfa o meno l'ipotesi nulla in base al *t-test* applicato alle stime dei parametri calcolate.

Si calcola quindi il *t-constrat* (*t*):

$$t = \frac{\mathbf{c}^T \boldsymbol{\beta}}{\sigma \sqrt{\mathbf{c}^T (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{c}}} \quad (2.19)$$

dove \mathbf{c} è il contrasto e serve a selezionare il task d'interesse, il numeratore rappresenta le stime dei parametri pesate per il contrasto e al denominatore i residui pesati per il contrasto. Nel vettore \mathbf{c} sono specificate le differenze tra i β . Ogni vettore contrasto è ortogonale rispetto agli altri poiché è indipendente ed è composto da valori interi negativi e positivi.

Una volta calcolato il valore *t*, devo conoscere o fissare i gradi di libertà (*df*) e la soglia di significatività (α), selezionata ad-hoc in base a considerazioni fatte sul segnale fMRI. I *df* sono dati da: $df=N \cdot P$, dove *N* è il numero di volumi acquisiti e *P* il rango della matrice \mathbf{X} (pari al numero di parametri β). In base a questi valori e al valore di *t* calcolato nel voxel, si decide se il voxel soddisfa o no l'ipotesi nulla. Solo i voxel attivi saranno i voxel presi in esame per le elaborazioni successive.

L'ultimo step consiste nella scelta del livello di significatività *p*. Solitamente si pone $p=0.05$ poiché tale soglia comporta una probabilità del solo 5% di riscontrare la presenza di falsi positivi (errori di tipo I). Poiché in ogni fetta è presente un numero elevato di voxel, utilizzando un $p=0.05$, ho una forte influenza dei falsi positivi nelle mappe di attivazione.

Per controllare gli errori di tipo I viene quindi utilizzata la disuguaglianza di Bonferroni. Questa disuguaglianza consiste nell'applicare *k* test statistici con il valore di soglia *a*, la probabilità a_T di osservare almeno una volta un valore maggiore di *a*, e quindi rifiutare l'ipotesi nulla, è:

$$a_T \leq k \cdot a \quad (2.20)$$

dove a_T rappresenta il vero tasso di errore che vogliamo controllare. Viene quindi effettuato ciascun t-test utilizzando il valore critico corrispondente a:

α_T/k . Il tasso di errore per tutti i voxel presi in considerazione sarà al massimo α_T . In pratica il p-value che vado ad applicare sarà pari a:

$$p=0.05/(n^\circ \text{ voxel analizzati}).$$

Questa correzione assume che tutti i voxel presi in considerazione siano spazialmente scorrelati, assunzione che però potrebbe far risultare questa procedura troppo conservativa. La correzione di Bonferroni presenta però lo svantaggio di incrementare la probabilità di errori di tipo II (non classificare un'attivazione quando invece è presente: falsi negativi). Il metodo di correzione di Bonferroni è utilizzato in SPM8 per la creazione delle mappe di attivazione cerebrale in fMRI ed è uno dei metodi *Family-Wise Error* (FWE), ai quali appartiene anche il Tukey's Honestly Significant Difference (HSD).^[38]

Un altro metodo utilizzato per prevenire gli errori di tipo I è il *false discovery rate* (FDR) *control*, proposto da Benjamini & Hochberg nel 1995, molto più efficace dei metodi FWE in quanto minimizza l'errore di tipo II e contemporaneamente controlla l'errore di tipo I.^[39] L'idea alla base di questo metodo è quella di controllare il rapporto tra il numero di ipotesi H_0 rigettate per errore e quelle complessivamente rifiutate. La procedura permette di gestire confronti multipli su test indipendenti e su test correlati. Il metodo FDR funziona bene nei contesti di analisi esplorativa dei dati in cui si è interessati a valutare tutte le possibili comparazioni, in quanto la sua potenza aumenta all'aumentare del numero dei confronti effettuati. Inoltre il FDR non necessita di assunzioni a priori sul tipo di distribuzione dei dati.

Ad esempio possiamo voler testare m ipotesi, $\{H^0_1, H^0_2, \dots, H^0_m\}$. Ipotizzando che m_0 di esse siano vere, non sapendo quali e quante, le altre $m-m_0$ saranno false. Si effettua un test che ci permetta di decidere se rifiutare o meno ciascuna di queste ipotesi. Se indichiamo con R il numero di ipotesi rifiutate, avremo $m-R$ ipotesi per le quali l'esito del test non è risultato significativo. Tra le R ipotesi rifiutate può esserci una certa ipotesi H^0_j che è vera ma l'esito del test ad essa associato porta alla conclusione errata. Se V è il numero di tali ipotesi, si può definire FDR come il valore atteso della proporzione di ipotesi rifiutate per errore sulle ipotesi totali rifiutate: $E(V/R)$. In pratica si calcola l'insieme dei test

statistici per tutte le ipotesi considerate (X_i) e le relative probabilità associate (P_i), con $i=1, \dots, m$; si dispongono le probabilità in ordine crescente e si individua il valore k per cui è vera la condizione

$$k = \max \left\{ i : p_{(i)} \leq \frac{i}{m} \frac{q}{\sum_{i=1}^m \frac{1}{i}} \right\} \quad (2.21)$$

in cui q è la probabilità scelta (solitamente $q=0.05$). Quindi in fine si rifiutano tutte le ipotesi H_n^0 corrispondenti alle probabilità p_n per $n=1, \dots, k$.^[40]

Un altro metodo utilizzato in fMRI è la *Random Field Theory* (RFT) che utilizza i risultati che danno la caratteristica di Eulero (CE) attesa per una mappa statistica smooth che è stata sottoposta ad una operazione di sogliatura. E' necessario notare che la CE conduce direttamente al numero previsto di cluster sopra ad una determinata soglia.

L'applicazione della RFT procede per stadi. In primo luogo si stima la correlazione spaziale della mappa statistica. Poi si usano i valori di correlazione ottenuti all'interno dell'equazione RFT opportuna per dare l'atteso CE alle diverse soglie. Questo permette di calcolare la soglia alla quale ci si aspetta che il 5% delle equivalenti mappe statistiche ottenute sotto le ipotesi nulle contengano al più un solo cluster sopra la soglia.^[41]

2.3 INDIVIDUAL BASED HRF

Poiché la risposta emodinamica varia a seconda del soggetto e dell'area cerebrale da analizzare, si è pensato in questo studio di costruire una risposta emodinamica *ad hoc* per ogni soggetto da utilizzare poi per la generazione delle mappe di attivazione fMRI. Ciò permetterà di confrontare i risultati ottenuti utilizzando le hrf note dalla letteratura con quelli ottenuti usando l'hrf specifica, andando quindi a valutare qual è il modello ottimo per l'hrf nell'analisi dell'attivazione cerebrale a seguito di un task motorio.

Nella costruzione dell'ibHRF viene ripresa la formulazione proposta da Handwerker (2.5) ponendo però la costante C a zero e considerando il vettore $x(t)$ pari al vettore dei tempi t in secondi. La ibHRF sarà quindi definita da cinque parametri: $A_1, A_2, \tau_1, \tau_2, \delta_1$. I parametri da stimare sono però sei ed il vettore dei parametri è :

$$p = [a_1, a_2, \tau_1, \tau_2, \delta_1, C]^T \quad (2.22)$$

dove C controlla il valore basale di risonanza dopo la convoluzione tra $u(t)$ e $h(t)$. La funzione risulta così composta dalla somma di due componenti: $y_1(t)$ positiva e $y_2(t)$ negativa.

Quindi $y(t) = y_1(t) + y_2(t)$:

$$y_1(t) = A_1 \left(\frac{t - \delta_1}{\tau_1} \right)^2 \frac{e^{-\left(\frac{t - \delta_1}{\tau_1} \right)^2}}{\tau_1} \quad \text{per } \delta_1 < t < T$$

$$y_2(t) = A_2 \left(\frac{t - \delta_2}{\tau_2} \right)^2 \frac{e^{-\left(\frac{t - \delta_2}{\tau_2} \right)^2}}{\tau_2} \quad \text{per } \delta_2 < t < T$$

(2.23)

I parametri τ_1 e τ_2 sono proporzionali all'ampiezza a metà altezza FWHM (Full Width at Half Maximum) rispettivamente di $y_1(t)$ e $y_2(t)$, δ_1 e δ_2 descrivono il ritardo in secondi rispettivamente della curva positiva e negativa. I valori di picco sono stati calcolati a partire dai valori di t_{max} e t_{min} per cui si annullano le derivate prime, fatte rispetto al tempo, rispettivamente di $y_1(t)$ e $y_2(t)$:

$$\frac{dy_1(t)}{dt} = 0 \rightarrow t_{max} = \delta_1 + \tau_1 \rightarrow y_1(t_{max}) = a_1 = \frac{A_1}{\tau_1 e}$$

(2.24)

$$\frac{dy_2(t)}{dt} = 0 \rightarrow t_{min} = \delta_2 + \tau_2 \rightarrow y_2(t_{min}) = a_2 = \frac{A_2}{\tau_2 e}$$

dove t_{\max} rappresenta l'istante in corrispondenza del quale ho il picco positivo, t_{\min} l'istante temporale per cui ho il picco negativo e δ_2 è dato da:

$$\delta_2 = \delta_1 + \tau_1 + \tau_1/2. \quad (2.25)$$

Come vedremo nel capitolo 4, per modellare la *two-gamma HRF* di Handwerker in base al soggetto in esame, si è proceduto alla stima del vettore p attraverso l'uso di uno stimatore non lineare (`lsqnonlin`) a partire dai dati forniti dalle mappe di attivazione ottenute con la canonical hrf di SPM.

CAPITOLO 3

DATA SET

In questo capitolo vengono descritti il protocollo sperimentale ed il metodo di acquisizione delle immagini fMRI applicati ai nove soggetti che sono stati reclutati per questo studio. Sarà anche esplicitato il pre-processing eseguito sui dati raccolti attraverso il software SPM8® per ridurre il rumore presente nelle immagini prima dell'applicazione del GLM, al fine di ottenere mappe di attivazione cerebrali da immagini confrontabili tra loro.

3.1 ACQUISIZIONE DEI DATI

Il data-set sperimentale è stato acquisito presso la sezione di Neuroradiologia dell'Ospedale Civile Maggiore di Borgo Trento in collaborazione con il reparto di Neurologia del Policlinico Universitario di Borgo Roma di Verona. Le immagini MR dei 9 soggetti sono state acquisite attraverso lo scanner MAGNETOM Allegra a 3T (Siemens, Erlangen, Germany), dotato di Echo-Planar Imaging (EPI), impiegando una bobina standard di ricezione/trasmissione per la testa e cuscini per minimizzare i movimenti della testa (Fig. 3.1).

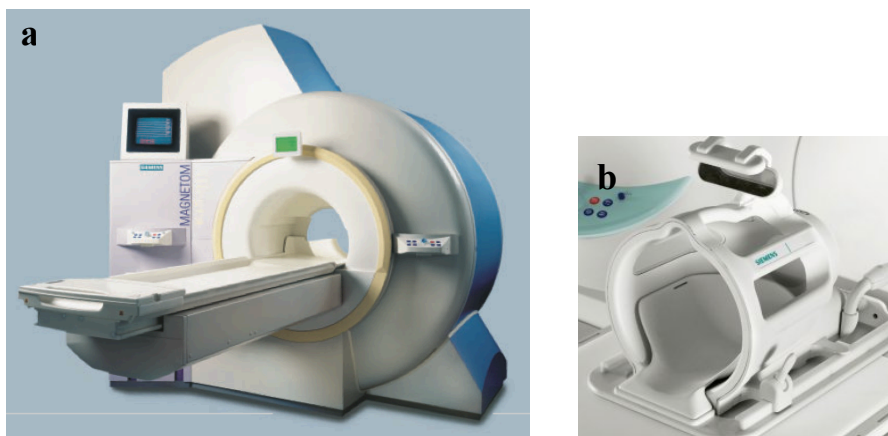


Figura 3.1: Magnetom Allegra della Siemens (a) con bobina (b).^[42]

Per lo studio è stato utilizzato uno strumento MR compatibile per permettere il movimento corretto della mano.

La sessione di acquisizione comincia con una fase di training, in cui il soggetto in esame è istruito sul metodo di esecuzione del task motorio richiesto e sul protocollo sperimentale. Successivamente vengono acquisite sia le immagini anatomiche T_1 -pesate in sagittale che le immagini fMRI T_2^* -pesate con sequenza EPI in assiale. Sono state acquisite tre sessioni d'immagini funzionali, una per ognuno dei tre tipi di movimento: massimo, minimo e massimo post sforzo. Il movimento massimo consiste in una contrazione della mano con massima flessione delle dita, il movimento minimo in una contrazione della mano con minima flessione delle dita, il movimento massimo post-sforzo è eseguito in seguito ad una sessione di affaticamento della mano. In tabella 3.1 sono riportati i parametri utilizzati per l'acquisizione.

	N° volumi	N° fette	Dim. fetta	FOV	Dim. Voxel (mm)	TE (ms)	TR (s)
Anatomica	1	160	256x256	192x192	1x1x1	3	2.30
Funzionale	100	36	64x64	192x192	3x3x3	30	2.61

Tabella 3.1: Parametri di acquisizione per le immagini anatomiche e funzionali. Sono riportati: numero di volumi acquisiti per ogni sessione, il numero di fette acquisite per ogni volume, la dimensione della matrice della fetta, il Field of View (FOV), la dimensione del voxel in mm, il Time-echo (TE) in ms, il Time-Repetition (TR) in s.

3.2 DATA-SET e PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Per eseguire una corretta analisi sperimentale è necessario definire un protocollo appropriato e ripetibile. In fMRI, per poter riconoscere quali aree cerebrali si attivano durante un compito, si deve sottoporre il soggetto a determinati stimoli. Esistono tre diversi tipi di disegno sperimentale: *blocked*, *event-related* e *mixed*.

Il protocollo a blocchi (*blocked*) ha lo scopo di mantenere l'attenzione cognitiva o motoria durante il *task* presentando stimoli sequenziali di attivazione

alternati ad altri stimoli che presentano una condizione diversa (es. di riposo). Il *task* è il compito che il soggetto deve svolgere e può essere uno stimolo visivo, uditivo, cognitivo, sensitivo o un movimento attivo o passivo. Nel disegno sperimentale a blocchi la durata di ogni task è fissa (*block*) e costante. E' possibile alternare due condizioni diverse, "*AB block*" design, oppure alternare il task ad un periodo di riposo (*rest*) (Fig. 3.2). Questo tipo di protocollo garantisce dei risultati robusti, aumenta l'efficienza statistica e consente di rilevare un'ampia variazione del segnale BOLD rispetto alla *baseline* in quanto le risposte agli stimoli vanno a sommarsi tra loro in modo lineare.^[43] Tuttavia spesso può essere difficile stimare la risposta emodinamica poiché il segnale BOLD all'interno di ogni blocco, se il tempo di stimolazione non è sufficientemente lungo, non torna al valore di *baseline*.

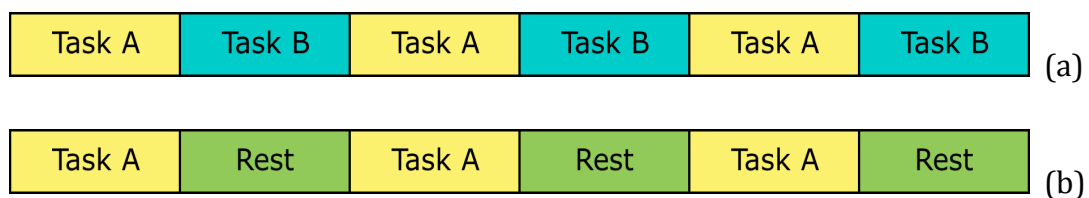


Figura 3.2: Paradigma a blocchi. AB block (a), active-rest block (b).

Il protocollo *event-related* è caratterizzato invece da due o più task, di breve durata, che si alternano in modo casuale sia nel tempo che nello spazio. L'intervallo di tempo che intercorre tra uno stimolo e l'altro è definito *interstimulus interval* (ISI) e solitamente è compreso tra i 2 ed i 20 s (Fig. 3.3). Questo protocollo è vantaggioso poiché è molto flessibile e quindi può essere modificato al fine di evitare effetti di apprendimento del *task*. L'*event-related* presenta però anche numerosi svantaggi: è necessario acquisire molti volumi al fine di compensare il basso rapporto segnale/rumore, non permette di conoscere a priori l'andamento della risposta emodinamica se due stimoli sono presentati a distanza non ottimale e fornisce effetti diversi sul segnale d'uscita in base alla durata dell'ISI.

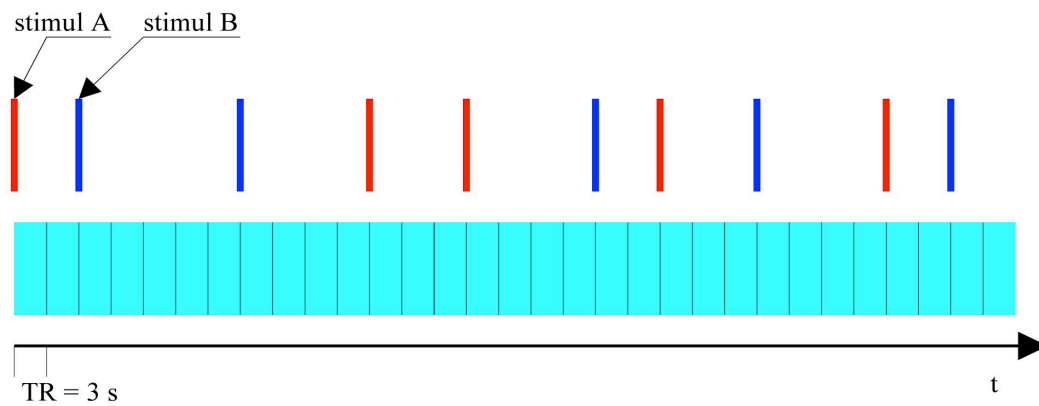


Figura 3.3: Event-related design con ISI variabile e due task diversi: stimol A (rosso) e stimol B (blu). Nella barra azzurra è riportata la successione dei volumi acquisiti con un TR=3 s.^[44]

I *mixed design* invece sono dati da una combinazione dei due precedenti tipi di paradigmi.

Il vantaggio dell'aver scelto un protocollo a blocchi nel nostro studio sta nel fatto che questo tipo di paradigma ha un alto potere di discriminare i voxel.

Il data-set per questo studio è composto da 9 individui sani, 3 femmine e 6 maschi (età media $30.11 \pm SD 4.37$). Il protocollo per tutti i soggetti è definito da 5 stati di rest alternati a 5 stati *active* (di attivazione motoria della mano), ognuno della durata di 10 volumi, per un totale di 100 volumi. Il TR che intercorre tra due volumi successivi è di 2.61 s (Fig. 3.4).

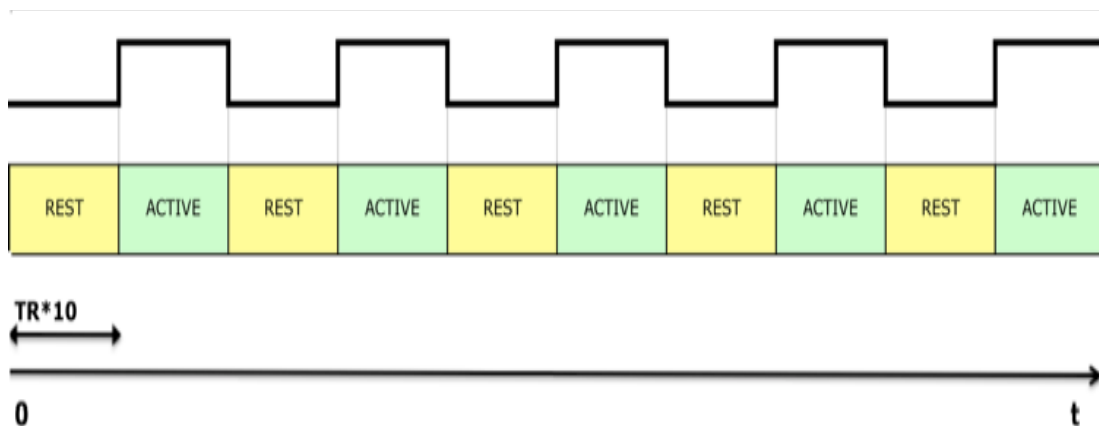


Figura 3.4: Protocollo sperimentale active-rest attuato per questo studio: blocchi da 10 volumi ciascuno e TR=2.61 s.

3.4 PRE-PROCESSING

Il pre-processing è costituito da una serie di elaborazioni nello spazio e nel tempo applicate alle immagini di risonanza magnetica al fine di minimizzare gli artefatti da movimento ed errori di allineamento, uniformare le immagini ad uno stesso spazio e riallinearle temporalmente.

Al data-set in esame sono stati applicati i seguenti filtraggi e trasformazioni implementati nel software SPM8®.

SLICE TIMING CORRECTION

Questa procedura è una elaborazione temporale attraverso cui vengono corrette le differenze nei tempi di acquisizione delle fette per le scansioni echo-planari. Ogni volume cerebrale è acquisito in fette. La correzione è necessaria affinché i dati su ogni fetta corrispondano allo stesso punto nel tempo poiché tra una fetta e l'altra intercorre un ritardo pari al più a $0.5 \cdot TR$.^[45]

L'interpolazione temporale corregge gli errori di allineamento nel tempo. Esistono tre diversi metodi per eseguirla: metodi lineari, spline e funzioni sinc. Questa correzione permette quindi il riallineamento della risposta emodinamica tra le varie fette.

REALIGNMENT

Il realignment, o *motion correction*, è la prima elaborazione spaziale applicata al data-set in esame. E' noto che il movimento della testa, sia esso volontario o involontario, è la causa principale di errore nelle immagini funzionali. Si riscontrano errori nel segnale misurato anche a seguito di un minimo movimento della testa di soli 4-5 mm. Inoltre se si fanno eseguire task motori, come ad esempio il movimento della mano nel nostro studio, questi causano un movimento involontario della testa. Attraverso l'uso di sistemi specifici che immobilizzano il capo e la suddivisione dell'esperimento fMRI in sottoesperimenti di durata limitata (4-6 minuti ciascuno) è possibile evitare l'affaticamento del soggetto e quindi ridurre l'errore da movimento volontario. Anche il respiro ed il battito cardiaco provocano il movimento involontario della

testa. Per eliminare gli artefatti da movimento si procede a riallineare gli assi del sistema di riferimento utilizzato da ogni immagine in modo che le immagini MRI acquisite abbiano tutte la stessa orientazione. Per riallineare le serie temporali acquisite di un soggetto viene utilizzato uno stimatore ai minimi quadrati ed una trasformazione spaziale rigida a 6 parametri. Viene definita inizialmente un'immagine di riferimento rispetto alla quale sono riallineate tutte le altre immagini. L'algoritmo di riallineamento utilizzato identifica i parametri di traslazione e rotazione (Fig. 3.5) scegliendo quelli che minimizzano una funzione costo definita e quindi rendono migliore la sovrapposizione dei volumi di riferimento. Per il riallineamento è stata usata come riferimento la prima scansione di ogni soggetto, durante la quale è assente la componente d'errore dovuta all'affaticamento.

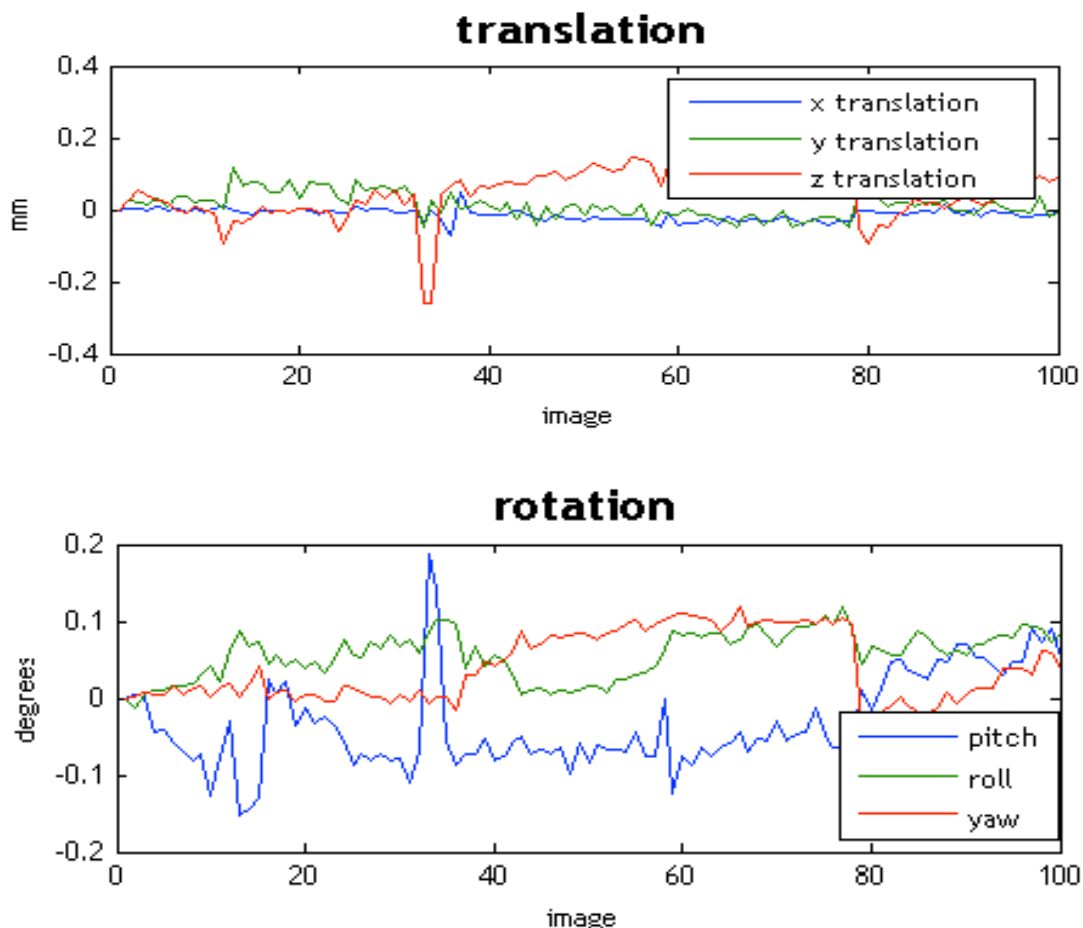


Figura 3.5: Rappresentazione dei movimenti della testa presenti nelle immagini acquisite. In alto sono riportate le traslazioni lungo gli assi x, y, z in mm, in basso le rotazioni intorno ai piani: pitch=y-z, roll=x-z, yaw=x-y. L'allineamento si riferisce al soggetto 1, durante l'esecuzione del movimento massimo.

SPATIAL SMOOTHING

Lo smoothing spaziale è una procedura di filtraggio spaziale che consente di aumentare il SNR. Questo algoritmo utilizza un filtro di tipo Gaussiano la cui distribuzione del kernel è di tipo normale. L'ampiezza del filtro è espressa in Full Width Half Maximum (FWHM), pari all'ampiezza della funzione a metà altezza di picco. Se la distribuzione Gaussiana ha varianza σ^2 allora $FWHM \approx 2.36\sigma$. Tipici valori della FWHM in fMRI sono $3-10\text{mm}$, che corrisponde a $1-3$ voxel.^[8] Per questo studio è un FWHM di 6 mm.

L'algoritmo di smoothing spaziale assegna ad ogni voxel un nuovo valore pari alla media pesata dei valori nei voxel adiacenti andando ad eliminare le alte frequenze spaziali. I dati fMRI presentano un alto grado di correlazione dovuto alla somiglianza sia dal punto di vista funzionale che del sistema vascolare di aree cerebrali adiacenti. In seguito viene riportato un confronto tra l'immagine originale e l'immagine dopo lo smoothing (Fig. 3.6).

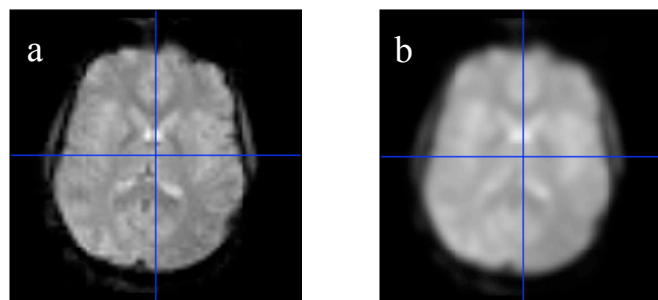


Figura 3.6: (a) Immagine originale (riallineata), (b) immagine dopo lo smoothing spaziale con FWHM=6mm. Le immagini si riferiscono al soggetto1.

Altri vantaggi associati allo smoothing spaziale sono: miglioramento della validità dei test statistici in quanto rende la distribuzione dell'errore più normale e adattamento delle variazioni anatomiche e funzionali tra soggetti (andando ad aumentare la precisione della sovrapposizione delle regioni cerebrali tra i vari soggetti). Lo smoothing provoca però una lieve riduzione della risoluzione spaziale delle immagini, un inspessimento e sfocatura dei contorni (l'immagine risulterà tanto più sfocata quanto più FWHM è alto (Fig.3.7)).

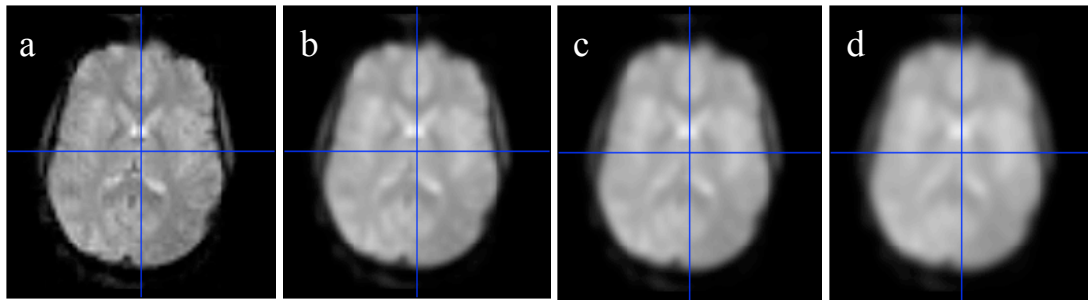


Figura 3.7: Variazione dell'immagine, relativa al soggetto 1, in uscita dall'algoritmo di smoothing al variare del valore FWHM. (a) immagine originale, (b) FWHM=4mm, (c) FWHM=6mm, (d) FWHM=8mm.

NORMALIZATION

L'algoritmo di normalizzazione ha lo scopo di normalizzare i volumi acquisiti di ogni soggetto ad uno spazio comune, andando a compensare le differenze di forma esistenti tra i cervelli di persone diverse, rendendone possibile il confronto quantitativo. E' noto che il cervello umano ha una morfologia molto variabile, ad esempio il cervello di due soggetti differisce di circa il 30% sia per volume (in un adulto varia tra i 1100-1500 cc) che per forma.^[46] Lo spazio comune cui vengono riportati i volumi acquisiti è definito spazio stereotassico e quello comunemente usato, anche in questo studio, è l'atlante di Talairach.^[45] La normalizzazione ha come riferimento la commissura anteriore (tratto di fibre che connette i due emisferi cerebrali situata in posizione anteriore nell'encefalo). I valori misurati dalla normalizzazione rappresentano la distanza in millimetri dall'origine del sistema di riferimento considerato.

La normalizzazione stereotassica viene eseguita per individuare le aree cerebrali tramite semplici coordinate standardizzate, permettendo operazioni di medie tra soggetti diversi ed il confronto dei risultati ottenuti con quelli di altri studi. Questa elaborazione ha un'elevata complessità temporale e fornisce in uscita immagini con risoluzione spaziale inferiore rispetto a quelle iniziali.

L'algoritmo fornito da SPM8 opera andando a minimizzare la somma delle differenze quadratiche tra l'immagine che viene elaborata ed una combinazione lineare di una o più immagini *template* (di riferimento). Viene poi definita la trasformazione affine ottima a 12 parametri e successivamente eseguita la registrazione facendo corrispondere i volumi cerebrali delle immagini fMRI con

quelli della template. Infine vengono stimate le deformazioni non lineari necessarie ad ottenere una corrispondenza ottima tra i volumi.

Sia le immagini fMRI che le immagini anatomiche sono state normalizzate allo stesso spazio stereotassico.

COREGISTRATION

La coregistrazione è l'ultima elaborazione spaziale applicata alle immagini acquisite. Questa tecnica consente di allineare le immagini funzionali del soggetto all'immagine anatomica (immagine T₁-pesata) di riferimento. Si ottiene così una corrispondenza spaziale tra tutte le immagini grazie alla quale si possono ricavare le informazioni di tipo funzionale sulle strutture cerebrali. Ovviamente le immagini anatomiche presentano una migliore risoluzione spaziale rispetto alle funzionali. La registrazione permette di ottenere una mappa delle corrispondenze per ogni voxel dell'immagine sorgente (per questo studio la prima immagine funzionale acquisita) con l'immagine anatomica di riferimento. Tutte le altre immagini funzionali saranno poi allineate alla prima immagine funzionale riallineata all'anatomica. Le immagini funzionali vengono poi ricampionate nella nuova disposizione. Alle immagini funzionali sono quindi state applicate 3 rotazioni e 3 traslazioni rigide nello spazio 3D.

CAPITOLO 4

GENERAZIONE DI MAPPE DI ATTIVAZIONE

In questo capitolo verrà descritto il procedimento utilizzato per la generazione delle mappe di attivazione fMRI, riportando inoltre tutti i parametri utilizzati nelle diverse procedure di elaborazione delle immagini. Le fasi che costituiscono l'elaborazione dei dati sono: il pre-processing, l'analisi statistica eseguita su ogni soggetto utilizzando le hrf fornite dal software SPM8, la generazione dell'ibHRF, l'applicazione dell'analisi statistica utilizzando l'ibHRF e l'analisi di secondo livello (o di gruppo) effettuata sull'insieme dei soggetti.

Tutte le elaborazioni descritte in questo studio sono state eseguite utilizzando MatLab R2010a, versione 7.10. distribuito da *The Math Works*©. L'insieme dei software utilizzati è composto da due toolbox di Matlab®: SPM e MarsBaR (MARSeille Boite A Region d'interest), versione 0.42, toolbox di SPM,

<http://marsbar.sourceforge.net/>.

Il primo è utilizzato per la generazione delle mappe di attivazione fMRI, mentre il secondo è impiegato per la determinazione delle Region of Interest (ROI) nelle stesse mappe.

4.1 PRE-PROCESSING

Tutte le operazioni di pre-processing sono state eseguite in SPM8 (vedi paragrafo 3.3) e sono state applicate ad ogni sessione (massimo, minimo, post-sforzo) acquisita per ognuno dei 9 soggetti.

Tutte le immagini funzionali ed anatomiche acquisite in formato DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) sono state convertite in formato Analyze, attraverso la funzione “DICOM Import” presente in SPM8.

La prima elaborazione delle immagini fMRI consiste nello slice timing e restituisce per ogni immagine una nuova immagine il cui nome è quello del file originale a cui viene posto il prefisso “a”: a*.img e a*.hdr. Successivamente sono stati inseriti i parametri di acquisizione: 100 volumi, number_of_slices=36, TR=2.61s, reference slice=18 (che corrisponde alla fetta centrale del volume) e slice_order=[36:-1:1], ossia ordine discendente.

Le immagini ottenute dopo il riallineamento temporale sono sottoposte a riallineamento spaziale. Si utilizza la funzione “Realign (Est&Res)”, si inseriscono le immagini ottenute dal riallineamento temporale nel campo “Session”, lasciando impostati i valori di default. In uscita le immagini riallineate acquistano il prefisso “r”.

Il terzo step del pre-processing consiste nello smoothing spaziale. Si utilizza la funzione “Smooth” inserendo in “Images_to_Smooth” le immagini precedentemente elaborate (ra*.img), ponendo FWHM=[6 6 6]: smoothing di 6mm. Le immagini ottenute acquistano il prefisso “s”: s*.img e s*.hdr.

La successiva elaborazione consiste nella normalizzazione allo spazio stereotassico. Si seleziona “Normalise (Est&Wri)”. In “Source Image” si inseriscono le immagini anatomiche, in “Images_to_Write” tutte le immagini funzionali elaborate precedentemente e le immagini anatomiche, che devono essere normalizzate poiché su di esse verranno visualizzate le aree d’attivazione, ed infine in “Template_Image” l’immagine T1.nii fornita da SPM8.

La template MNI è ottenuta mediante la media di una serie di immagini anatomiche T1-pesate di soggetti adulti ed è ricavata dagli atlanti cerebrali.^[47] Le immagini normalizzate vengono salvate con il prefisso “w”: w*.img e w*.hdr (Fig. 4.1).

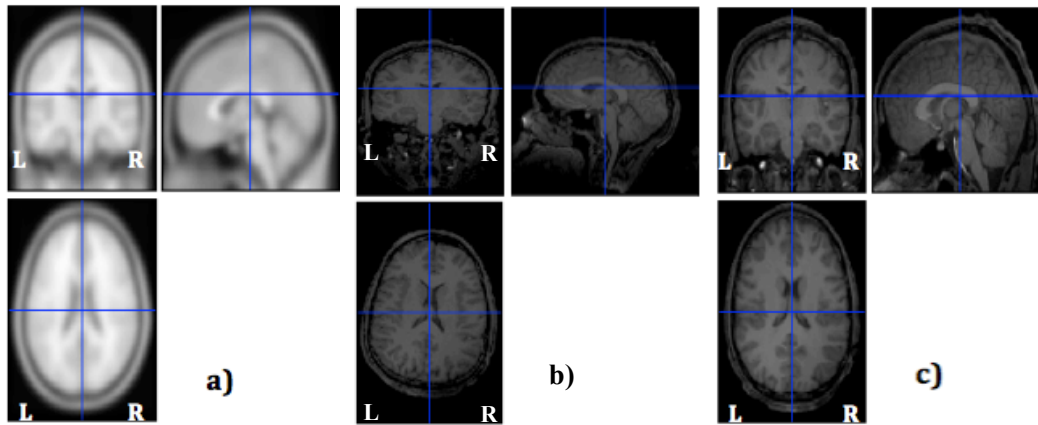


Figura 4.1: Immagine anatomica T1.nii di riferimento (a), immagine anatomica non normalizzata (b) e normalizzata (c) del soggetto 1.

L'ultimo step del pre-processing consiste nella coregistrazione delle immagini funzionali sull'anatomica "Coregister (Est&Res)". Si inserisce come immagine di riferimento l'anatomica T1-pesata normalizzata del soggetto in esame nel campo "Reference Image", in "Source_Image" il primo volume funzionale precedentemente talarizzato e in "Other_Images" le altre immagini funzionali talarizzate. Le immagini assumono ora il prefisso "r" (Fig. 4.2, 4.3).

Alla fine del pre-processing le immagini funzionali sono memorizzate in rwsra*.img e rwsra*.hdr.

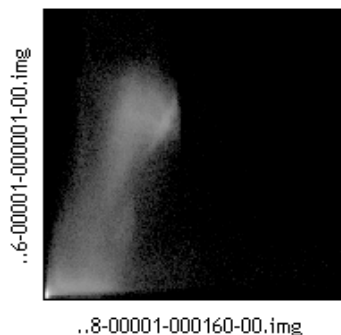
Normalised Mutual Information Coregistration

$$X1 = 1.000*X - 0.006*Y + 0.010*Z - 0.533$$

$$Y1 = 0.006*X + 1.000*Y + 0.011*Z - 0.964$$

$$Z1 = -0.010*X - 0.011*Y + 1.000*Z - 1.341$$

Original Joint Histogram



Final Joint Histogram

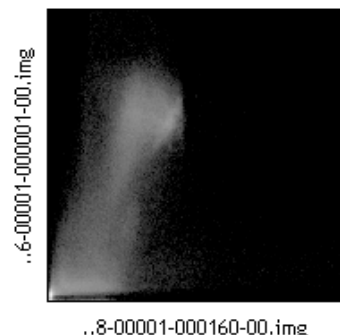


Figura 4.2: Joint Histogram prima e dopo la coregistrazione. L'istogramma è definito come una matrice NxM dove N è il numero di voxel dell'immagine di riferimento (il primo volume della funzionale normalizzata) e M il numero di voxel dell'immagine sorgente (immagine anatomica normalizzata del soggetto). Il joint histogram è costruito in base al numero di corrispondenze tra il voxel dell'immagine di riferimento ed il corrispondente nell'immagine sorgente.^[24] Nelle equazioni riportate in alto X, Y, Z sono le coordinate del voxel nell'immagine anatomica normalizzata mentre X1, Y1, Z1 sono le coordinate del voxel corrispondente dopo la coregistrazione nell'immagine funzionale. I coefficienti numerici rappresentano i coefficienti della matrice di trasformazione associata.^[48] Le immagini si riferiscono al soggetto 1.

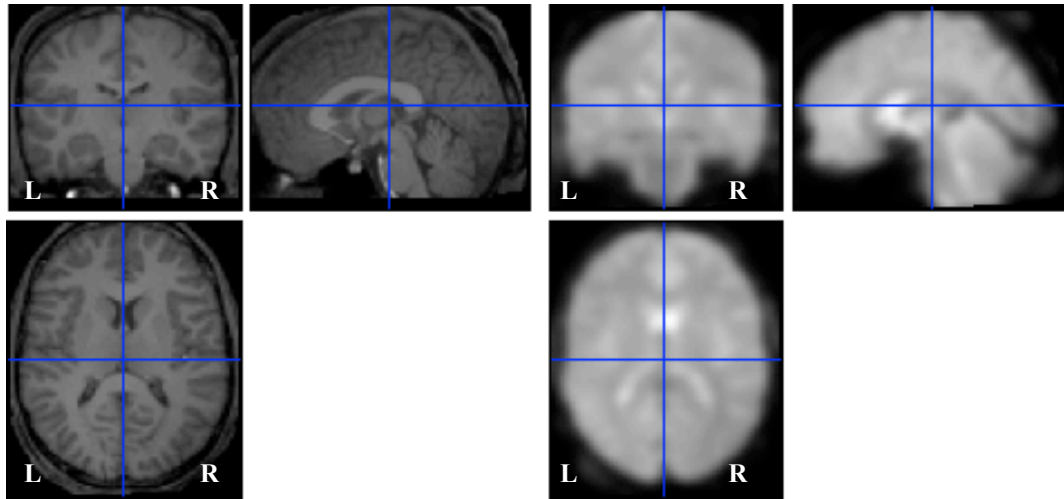


Figura 4.3: Rappresentazione delle tre sezioni (frontale, sagittale, orizzontale) dell'immagine anatomica normalizzata (a sinistra) e dell'immagine funzionale normalizzata (a destra) dopo la coregistrazione. Le immagini si riferiscono al soggetto 1.

4.2 IMPLEMENTAZIONE ED APPLICAZIONE HRF FISSE

Di seguito verrà descritto il procedimento per la determinazione delle mappe di attivazione utilizzando le hrf fisse disponibili in SPM8: canonical hrf e la combinazione con le sue derivate temporale e dispersiva.

4.2.1 ANALISI DI PRIMO LIVELLO (GLM)

Il disegno sperimentale è definito dalla matrice, *design matrix*, che contiene tante righe quanti sono i volumi acquisiti con la fMRI (asse dei tempi) ed una colonna per ogni variabile indipendente (parametri beta).^[45] Il GLM è il modello che viene costruito in questa fase ed è utilizzato per la stima dei parametri beta che vengono ricavati attraverso una stima ai minimi quadrati lineari in SPM. Per eseguire la stima dei parametri incogniti si seleziona "Specify 1st-level" introducendo le seguenti specifiche:

- In "Directory" si inserisce il percorso nel quale verrà salvato il file SPM.mat contenente: informazioni riguardanti la design matrix (campioni del modello, matrice di filtraggio temporale e matrice dei pesi,...), informazioni sulla hrf utilizzata (durata, tempo di campionamento,...), contrasto, covarianza, informazioni sul disegno sperimentale applicato, informazioni sulla non-sfericità, etc.

- In “Units_for_design” si seleziona Scan che rappresenta l’unità di misura dell’onset tra i volumi.
- In “Interscan_interval” si inserisce il TR usato: 2.61s.
- In “Data e Design”:
 - nel campo “Scan” si inseriscono le immagini funzionali ottenute alla fine del pre-processing (rwrse*.img)
 - nel campo “Condition” si indica il tipo di task; in “Onset” si inserisce la matrice dei blocchi [11 31 51 71 91] ed in “Duration” il numero di volumi contenuti in ogni blocco del disegno sperimentale.

Infine si seleziona la forma della risposta emodinamica che si vuole utilizzare nell’analisi. Per la prima parte di questo studio, per ognuno dei tre movimenti e per ogni soggetto, si sono utilizzate tre tipi di design matrix (vedi figura 2.3): canonical_hrf, canonical_hrf + Time derivative, canonical_hrf + Time and Dispersion derivatives. I modelli relativi ai tre tipi di derivate utilizzate sono rappresentati in Fig. 4.4.

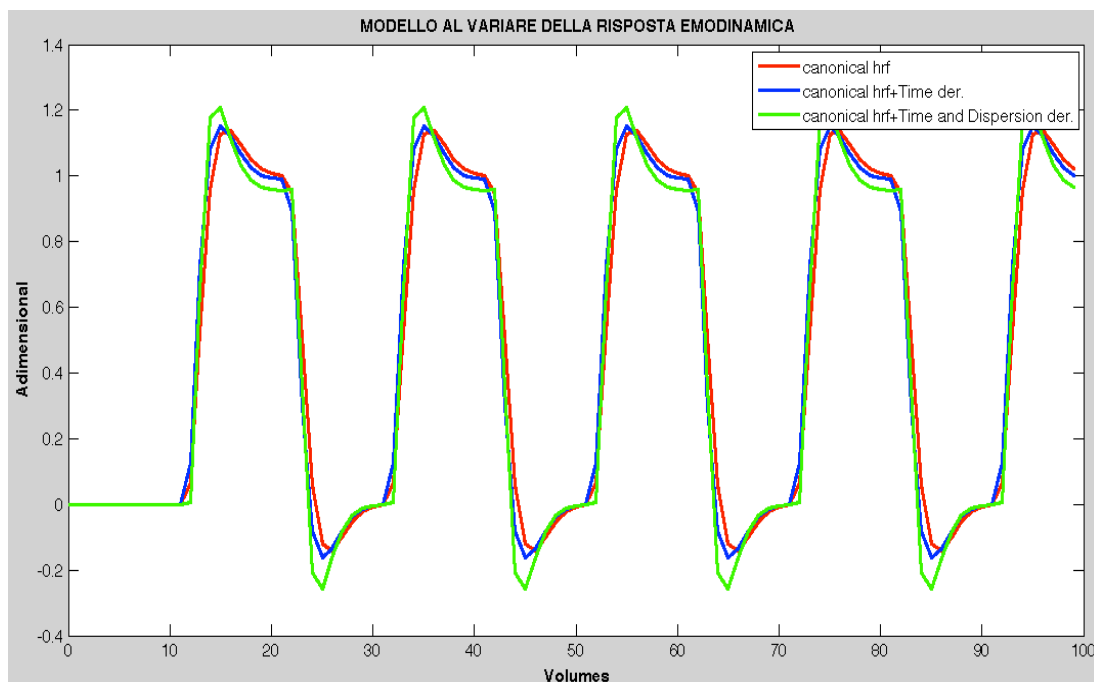


Figura 4.4: Confronto tra gli andamenti dei modelli in base all’hrf utilizzata: canonical_hrf (rosso), canonical_hrf più la derivata temporale (blu) e canonical_hrf più le derivate temporale e dispersiva (verde).

4.2.2 STIMA E RISULTATI

Il file SPM.mat generato dalla “1st level analysis” è il file in ingresso al successivo processo di stima (“Results”). Viene così eseguita la stima dei parametri β per ognuno dei file SPM.mat generati. Per visualizzare le mappe di attivazione relative al task di attivazione motoria si utilizza un t-contrast del tipo:

- [1 0] canonical_hrf
- [1 0 0] canonical_hrf+Time derivative
- [1 0 0 0] canonical_hrf+Time e Dispersion derivatives

Il valore “1” è posto in corrispondenza del parametro beta relativo alla canonical hrf (prima colonna della design matrix) perché la maggior parte delle aree che risultano attive senza considerare le derivate presentano la stessa attivazione che si otterrebbe considerando i termini derivativi singolarmente. Inoltre le zone che presentano attivazione considerando solo i termini derivativi sono di difficile interpretazione funzionale e fisiologica.^[45]

Per ottenere le mappe di attivazione si è applicata la correzione FWE rate. Si è deciso di utilizzare per tutti i soggetti la correzione FWE poiché presentava una minor dispersione dell’attivazione cerebrale rispetto alle mappe ottenute senza la correzione nel test statistico (Fig. 4.5). Sono comunque state valutate le mappe ottenute sia con la correzione (FWE) che senza ($p < 0.001$).

Ottenuta la mappa di attivazione è stato salvato il file temporaneo d’uscita del processo di stima e visualizzazione xSPM, nel quale sono contenuti i dati relativi ai voxel attivi. Alla fine dello studio con le hrf disponibili in SPM8 sono state ottenute 81 mappe di attivazione.

Per ogni mappa di attivazione ottenuta con le hrf convenzionali è stato valutato il numero di voxel totali attivi nel volume cerebrale, dato dal numero di colonne della XYZ contenuta nella struttura xSPM.

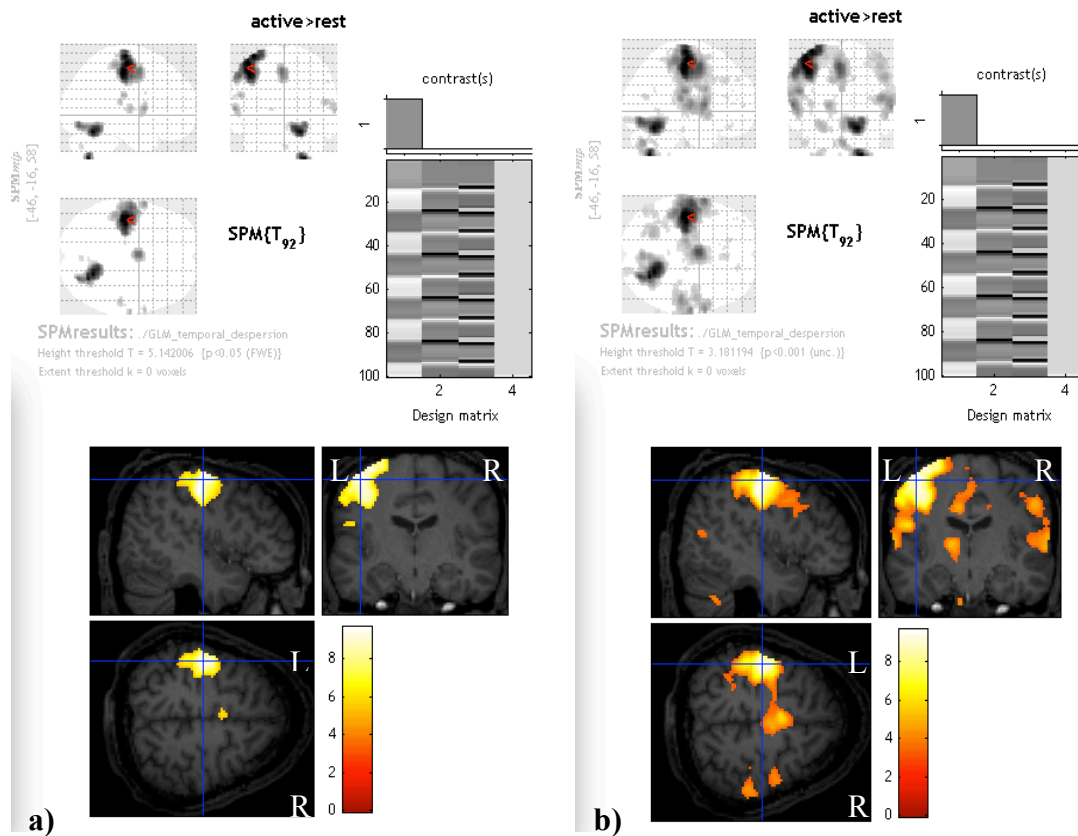


Figura 4.5: Esempio di mappa di attivazione con due diversi livelli di significatività. a) Mappa di attivazione ottenuta con correzione del tipo FWE. b) Mappa di attivazione ottenuta senza correzione ($p < 0.001$). Si nota una maggior dispersione dell'attivazione nell'immagine b). Le immagini si riferiscono al soggetto 2.

4.3 IMPLEMENTAZIONE ED APPLICAZIONE DELL'HRF INDIVIDUAL-BASED

A partire dal dato fMRI contenuto nei voxel attivi, individuati in seguito ad un'analisi GLM in cui si è utilizzata la *canonical_hrf*, si è costruito una *hrf* relativa ad ogni singolo soggetto in base al tipo di movimento svolto. L'*ibHRF* è una funzione lineare calcolata a partire da sei parametri medi ottenuti attraverso uno stimatore non lineare. Verranno quindi definite 3 *ibHRF* per ogni soggetto, una per ogni tipo di task. Di seguito verrà descritta l'implementazione per la costruzione dell'*ibHRF* eseguita attraverso funzioni scritte in codice Matlab.^[49]

Il programma principale (**Prog_main.m**) richiama le funzioni specifiche implementate per la costruzione dell'*ibHRF* (**Gamma_Fit.m**, **objective.m**,

hrf_HW.m, ProtMod.m). Una volta generata la *ibHRF*, essa verrà inserita nel file *SPM.mat* per l'analisi di primo livello.

In primo luogo nel programma principale si crea una matrice 4D contenente tutte le immagini funzionali pre-processate relative a ciascun movimento per ogni soggetto. A partire dal file *xSPM.mat*, ottenuto nell'elaborazione precedente, si crea una maschera 3D in cui i voxel attivi sono posti a 1 e i voxel non attivi a 0. La costruzione della maschera si basa sulle coordinate dei voxel attivi contenute in *xSPM.XYZ.mat*.

Sono stati utilizzati i seguenti parametri:

- $TS=2.61s$, pari all'intervallo di campionamento;
- Tf è la durata in secondi di due blocchi d'acquisizione, un rest ed un active, ed è dato da:

$$Tf = 2 * 10 * TS \quad (4.1)$$

- $T=[0:TS:Tf-TS]$ è il vettore dei tempi dell'*hrf* da calcolare.
- K è la matrice di filtraggio temporale definita in *SPM.xX.K.XO*, W è la matrice di pesatura definita in *SPM.xX.W*.

A questo punto si procede alla stima dell'*ibHRF* attraverso la funzione *Gamma_fit* che richiama la funzione Matlab® *lsqnonlin* per la stima ai minimi quadrati non lineari del vettore dei parametri $p=[\delta_1, \tau_1, a_1, \tau_2, a_2, C]$.

I valori iniziali dei parametri da stimare sono valori tipici di una risposta emodinamica canonica, ed i vettori che definiscono il *lower bound* (*lb*) e l'*upper bound* (*ub*) di ogni parametro sono dati da:

$$p0=[0.8 \ 5.2 \ 0.16 \ 8 \ 0.0147 \ 656]' \quad lb=[0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0]' \quad ub=[20 \ 10 \ 10 \ 20 \ 5 \ 100]'$$

Si costruisce inoltre il vettore colonna dei dati (*KWvettData*), filtrati con la matrice **K** e pesati con la matrice **W** ed il vettore dei tempi (*t*) che verranno forniti come ingresso alla funzione *lsqnonlin* nonché alla funzione obiettivo *objective*, passata in ingresso allo stimatore.

La funzione obiettivo è necessaria allo stimatore per processare i dati in quanto a partire dai vettori p_0 , T e dai dati fMRI restituisce in uscita il fit del modello con i dati passati in ingresso (modello - dati). Il modello è costruito attraverso la funzione *ProtMod* che riceve in ingresso il numero di campioni del protocollo nT , l'hrf precedentemente calcolata ed il parametro C che rappresenta il valore dello zero del modello. Il modello è infine definito come il prodotto di convoluzione dello stimolo per la risposta emodinamica.

La funzione *hrf_HW* viene invocata all'interno della funzione *objective* prima della creazione del modello ed è utilizzata per il calcolo della risposta emodinamica. I parametri in ingresso alla funzione *hrf_HW* sono: il TR, il periodo active-rest in secondi ed i parametri δ_1 , τ_1 , a_1 , δ_2 , τ_2 , a_2 . La risposta emodinamica calcolata a partire dai parametri iniziali è l'ibHRF descritta nel paragrafo 2.3.

In uscita allo stimatore non lineare si ottengono il vettore dei parametri stimati, i residui ed i residui normalizzati. Infine si calcolano varianza, covarianza ed i coefficienti di variazione CV dei parametri appena stimati.

A partire dal vettore dei parametri ottenuto per ogni voxel attivo si stima il vettore dei parametri medi.

Poiché l'ibHRF deve contenere lo stesso numero di campioni dell'hrf fornita da SPM (197 campioni) per poter essere inserita nel file SPM.mat, è necessario ridefinire TS e Tf:

- TS1=0,16s ossia il passo di campionamento utilizzato da SPM. TS1 è utilizzato per suddividere la finestra d'osservazione in 197 intervalli. Il passo di campionamento è dato da:

$$TS1 = \frac{TR}{SPM \cdot xBF \cdot T} \quad (4.2)$$

dove TR=2.61s e SPM.xBF.T=16 è il numero di passi di campionamento considerati per ogni scansione di default per l'hrf in SPM8 (vedi codice Matlab di *spm_fmri_design*).

- $Tf1=32.1s$ è la durata della finestra d'osservazione ed è memorizzata in `SPM.xBF.length` ed è dato da:

$$Tf1 = 2 * 10 * TS1 \quad (4.3)$$

Alla funzione `hrf_HW` vengono dati in ingresso `TS1`, `Tf1` ed il vettore dei parametri medi ed in uscita viene restituita la risposta emodinamica individual-based.

Per utilizzare l'ibHRF è necessario modificare nel file `SPM.mat` la risposta emodinamica ed il modello nel seguente modo:

- viene salvata una copia del file `SPM.mat` ottenuto dal GLM utilizzando la `canonical hrf`;
- in `SPM.xBF.bf` si inserisce l'ibHRF calcolata per la sessione in esame;
- in `SPM.xX.X` viene sostituita la prima colonna inserendo il vettore che descrive il modello normalizzato dato dal prodotto di convoluzione tra il protocollo `u` e l'ibHRF:

$$x(t) = TR * (u(t) \otimes \text{ibHRF}(t)) \quad (4.4)$$

Una volta creati i file `SPM.mat` modificati per ognuna delle sessioni da analizzare è stata eseguita la stima dei parametri beta e l'analisi statistica. Il contrasto utilizzato è definito dal vettore $c=[1 \ 0]$ ed è stata applicata la correzione FWE rate, con $p=0.05$, per la generazione delle mappe di attivazione cerebrale. Anche per l'ibHRF vengono stimate due matrici beta, come per la `canonical hrf`.

Per ogni mappa di attivazione generata è stata salvata la struttura `xSPM` corrispondente. A partire dalla matrice XYZ contenuta in `xSPM.mat` sono stati conteggiati i voxel totali attivi nel volume cerebrale.

4.4 INDIVIDUAZIONE DELLE REGIONI D'INTERESSE

Attraverso l'utilizzo del toolbox MarsBaR, a partire dalle mappe di attivazione ottenute con la `canonical hrf` e l'ibHRF sono stati individuati tutti i cluster di

attivazione per ogni soggetto all'interno del volume cerebrale. L'interfaccia grafica di MarsBaR permette di selezionare nel campo "ROI definition" la funzione "Get SPM cluster(s)" ed attraverso l'utilizzo dell'opzione "Write all clusters" della funzione "Write ROI(s)" vengono create e salvate le ROI relative ai cluster d'attivazione. Le maschere sono in formato *maroi pointlist*. Le ROI vengono definendo il numero di voxel appartenente ai cluster d'interesse relativi a: area motoria primaria, area motoria supplementare e cervelletto (Fig. 4.6). E' stato anche calcolato il segnale medio all'interno del cluster motorio per i tre movimenti di ogni soggetto

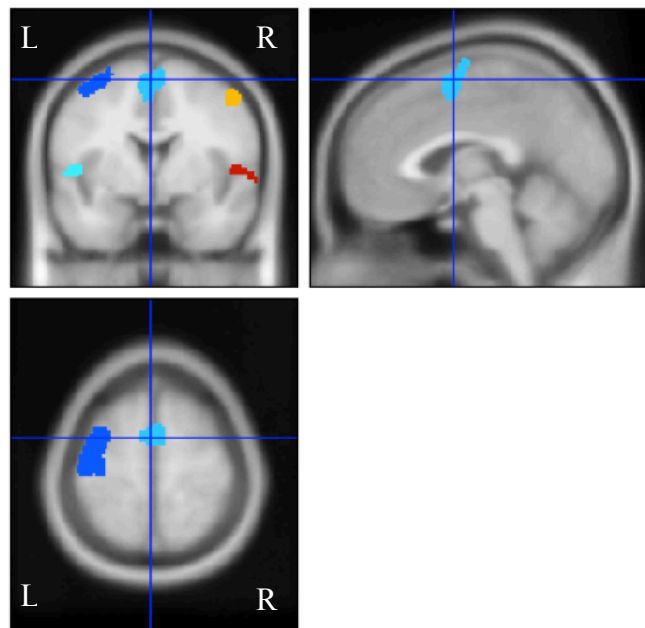


Figura 4.6: Visualizzazione dei cluster dei voxel attivi su un'immagine anatomica normalizzata utilizzata in MarSbaR di default. Le aree evidenziate sono: area motoria primaria (blu), area motoria supplementare (azzurro), area motoria primaria contro laterale (giallo), area uditiva sinistra (cobalto) e destra (rosso). L'immagine fa riferimento all'attivazione ottenuta attraverso l'utilizzo dell'ibHRF per il movimento massimo del soggetto 1.

4.5 UTILIZZO DELL'INDICE DI AKAIKE PER SCELTA DELL'HRF OTTIMA

Una volta conclusa l'analisi GLM, è necessario determinare il modello ottimo tra tutti quelli proposti, ossia quello che predice meglio i dati fornendo un'interpretazione migliore del fenomeno considerato ed un'elevata precisione dei parametri stimati. Il primo criterio di informazione su cui basare la scelta del modello statistico è stato proposto da Akaike nel 1973: l'*Akaike Information*

Criterion (AIC). In successione sono stati poi sviluppati altri criteri di informazione: il *Takeuchi Information Criterion* (TIC), il *Bayesian Information Criterion* (BIC).^[50] In questo studio viene utilizzato l'AIC come indice per la selezione del modello ottimo tra le risposte: canonical hrf, canonical hrf+Time derivatives, canonical hrf+Time e Dispersion Derivatives ed ibHRF.

I criteri di informazione tengono conto sia della bontà dell'adattamento del modello, ovvero quanto il modello riesce a descrivere bene il dato, sia della parsimonia, cioè il numero di parametri utilizzati per definire il modello. Un modello è considerato ottimo quando il suo errore di predizione è assimilabile ad un rumore bianco e quindi si presenta privo di dinamica. Poiché l'errore di predizione diminuisce all'aumentare della complessità del modello (all'aumentare del numero di parametri utilizzati) la valutazione della bianchezza dell'errore non è sufficiente per la scelta del modello.

L'indice di Akaike è dato da:

$$AIC = N * \log(WRSS) + 2 * M + \frac{2 * M * (M + 1)}{(N - M - 1)} \quad (4.5)$$

dove N è il numero di campioni del modello (100), M è la dimensione del vettore dei parametri (2 o 3 o 4) e WRSS sono i residui pesati contenuti nel file ResMS.img in uscita al test statistico di ogni modello.^[51] A partire dalle hrf fisse e dall'ibHRF si ottengono quattro design matrix per ogni soggetto relative a ciascuno dei tre tipi di movimento. Per il calcolo dell'AIC, relativo a questi quattro modelli è stata implementata la function **AIC_main.m** in cui si utilizza l'equazione 4.5. In dettaglio si calcola l'AIC corrispondente ad ogni voxel attivo all'interno del volume cerebrale per i quattro modelli utilizzati. Il parametro M varia al variare dell'hrf utilizzata in quanto è pari al numero dei parametri beta stimati (M=2 con canonical hrf e ibHRF; M=3 con canonical hrf + Time Derivative; M=4 con canonical hrf + Time and Dispersion Derivatives).

La maschera dei voxel attivi viene creata a partire dalla matrice contenuta nel file xSPM.mat in XYZ. Infine per scegliere il modello ottimo si confronta il valore AIC medio per ognuno di essi.

4.6 ANALISI DI GRUPPO

Selezionato il modello ottimo della risposta emodinamica, si è proceduto all'analisi di secondo livello ("Specify-2nd level"), ossia l'analisi di gruppo. Questa procedura permette di verificare le differenze nelle zone di attivazione tra soggetti diversi e tra differenti task.

I due tipi di analisi maggiormente utilizzate in letteratura sono: random (RFX) o fixed-effect (FFX). Si utilizza l'analisi FFX quando si vuole studiare solo la variabilità intra-soggetto, l'analisi RFX quando si vuole analizzare la variabilità della popolazione dalla quale sono stati presi i soggetti in esame.

Nell'analisi FFX si utilizza un modello lineare del tipo:

$$y_{ij} = w_i + \varepsilon_{ij} \quad (4.6)$$

dove, considerando N soggetti e n replicazioni dell'effetto per ogni soggetto, y_{ij} è il j-esimo effetto osservato per il soggetto i, l'errore è $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$ e w_i è l'effetto medio per il soggetto i-esimo e può essere definito come:

$$w_i = w_{pop} + a_i \quad (4.7)$$

in cui w_{pop} è l'effetto vero della popolazione e a_i è considerata costante per il soggetto i-esimo. L'analisi FFX è implementata nell'analisi di primo livello in SPM.

Nell'analisi RFX il modello utilizzato è lo stesso della 4.6 ma l'effetto medio w_i è definito come:

$$w_i = w_{pop} + z_i \quad (4.8)$$

in cui z_i è l'errore inter-soggetto per il soggetto i-esimo e $z_i \sim N(0, \sigma_z^2)$. Tale analisi è implementata nell'analisi di secondo livello in SPM.^[24]

Per valutare la differenza tra i nove soggetti esaminati in base al tipo di movimento attuato si è eseguita l'analisi RFX attraverso l'applicazione del "One-sample t-test", inserendo le immagini contrasto ottenute dall'analisi di primo livello tramite l'hrf ottima corrispondente. In questo modo è possibile ottenere

una mappa dei voxel significativamente attivi nel gruppo dei soggetti analizzati attraverso l'uso di un unico contrasto ($c=[1\ 0]$). Sono state ottenute tre mappe di attivazione per le quali si è calcolato il numero di voxel totali attivi e i voxel attivi delle singole ROI.

Per ottenere le differenze tra il task motorio relativo al movimento massimo e quello relativo al movimento massimo post-sforzo è stato eseguito il "two-sample t-test". In entrata sono date le immagini contrasto ottime, selezionate attraverso l'AIC, relative al movimento massimo per il gruppo 1 e le immagini contrasto ottime relative al movimento massimo post-sforzo per il gruppo 2. Per la visualizzazione delle mappe di attivazione sono stati utilizzati i seguenti contrasti: $[1\ -1]$ e $[-1\ 1]$.

E' stata applicata anche l'analisi di gruppo di primo livello sfruttando la Conjunction Analysis. Questa tecnica permette di ottenere un risultato di gruppo a partire dalle immagini funzionali di tutti i soggetti, definendo un vettore contrasto per ognuno di essi.^[52] Tuttavia questa procedura non permette di utilizzare l'hrf ottima di ogni soggetto in quanto non è possibile inserire nel processo di stima una hrf specifica per ogni individuo.

CAPITOLO 5

RISULTATI

In questo capitolo verranno presentati i risultati ottenuti attraverso i procedimenti di analisi descritti nel capitolo 4. Il capitolo sarà diviso principalmente in due parti: nella prima si confronteranno i risultati relativi all'impiego delle risposte emodinamiche standard e della ibHRF, nella seconda parte si riporteranno i risultati riguardanti i tre tipi di movimento studiati: movimento massimo, minimo e massimo post-sforzo. Saranno poi valutate le aree di attivazione ed infine verranno presentati i risultati ottenuti dall'analisi di gruppo.

5.1 CONFRONTO TRA RISPOSTE EMODINAMICHE STANDARD NELLE MAPPE DI ATTIVAZIONE

Nella determinazione delle mappe di attivazione utilizzando la canonical hrf e le sue combinazioni con le derivate temporale e dispersiva è stata utilizzata la correzione FWE rate ($p < 0.05$). La scelta del FWE è ottimale per tutte le sessioni acquisite tranne per quella relativa al movimento minimo del soggetto 3, per il quale si evidenziano voxel attivi con la FWE solo utilizzando la canonical hrf + Time and Dispersion Derivatives. Pertanto non sarà possibile andare a stimare l'ibHRF corrispondente per il soggetto 3 in quanto è calcolata a partire dalla mappa di attivazione corrispondente alla canonical hrf che, in questo caso, non fornisce attivazione. Riassumendo, nella prima fase dello studio, si sono ricavate 9 mappe d'attivazione per ciascun soggetto. In Fig. 5.1, 5.2 e 5.3 vengono riportate le mappe di attivazione ottenute in seguito ai tre movimenti.

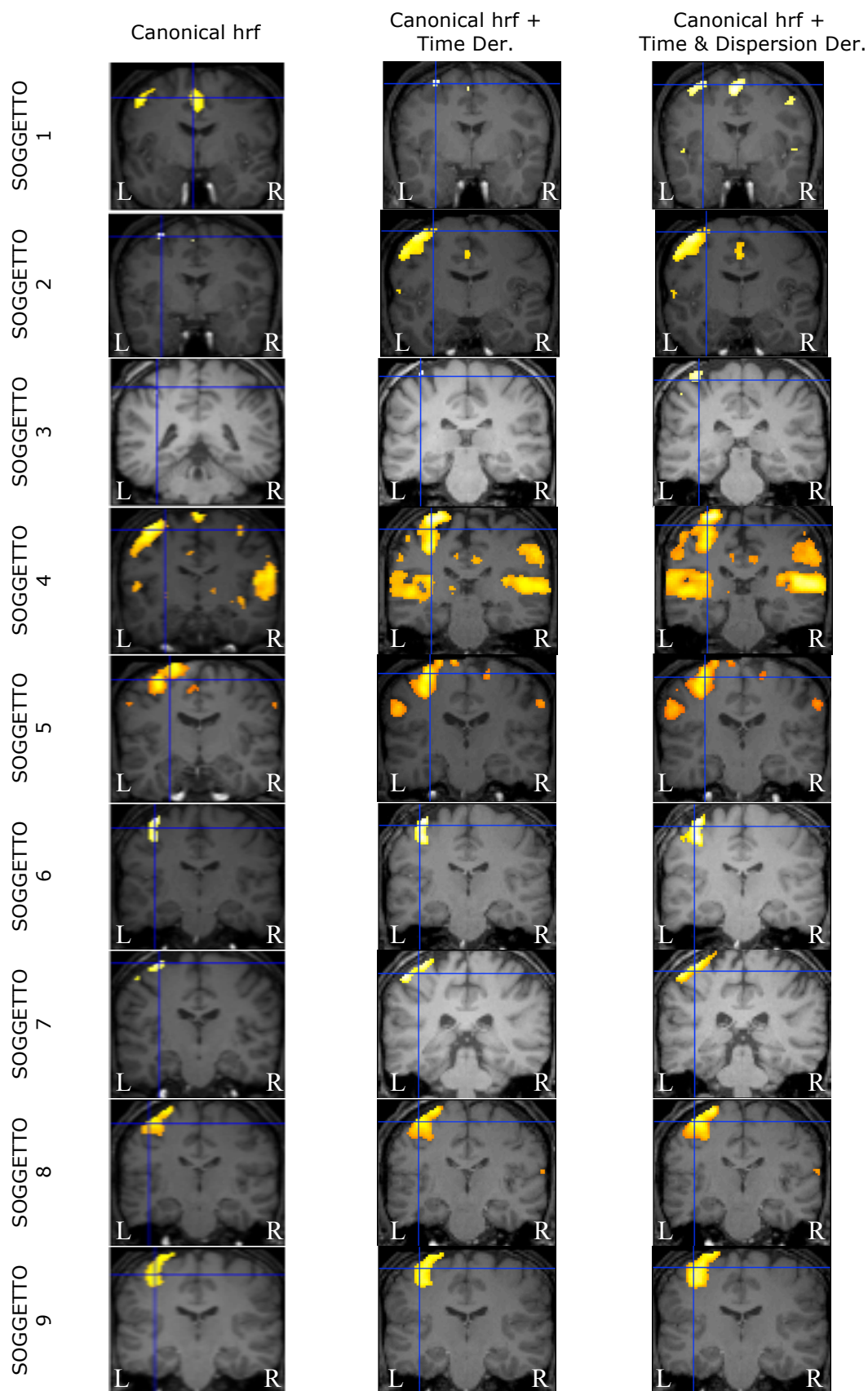


Figura 5.1: Mappe di attivazione ottenute per il movimento massimo in tutti i soggetti, in base all'hrf utilizzata: canonical hrf (prima colonna), canonical hrf + Time derivative (seconda colonna), canonical hrf + Time and Dispersion Derivatives (terza colonna). Le immagini fanno riferimento alla sezione sagittale.

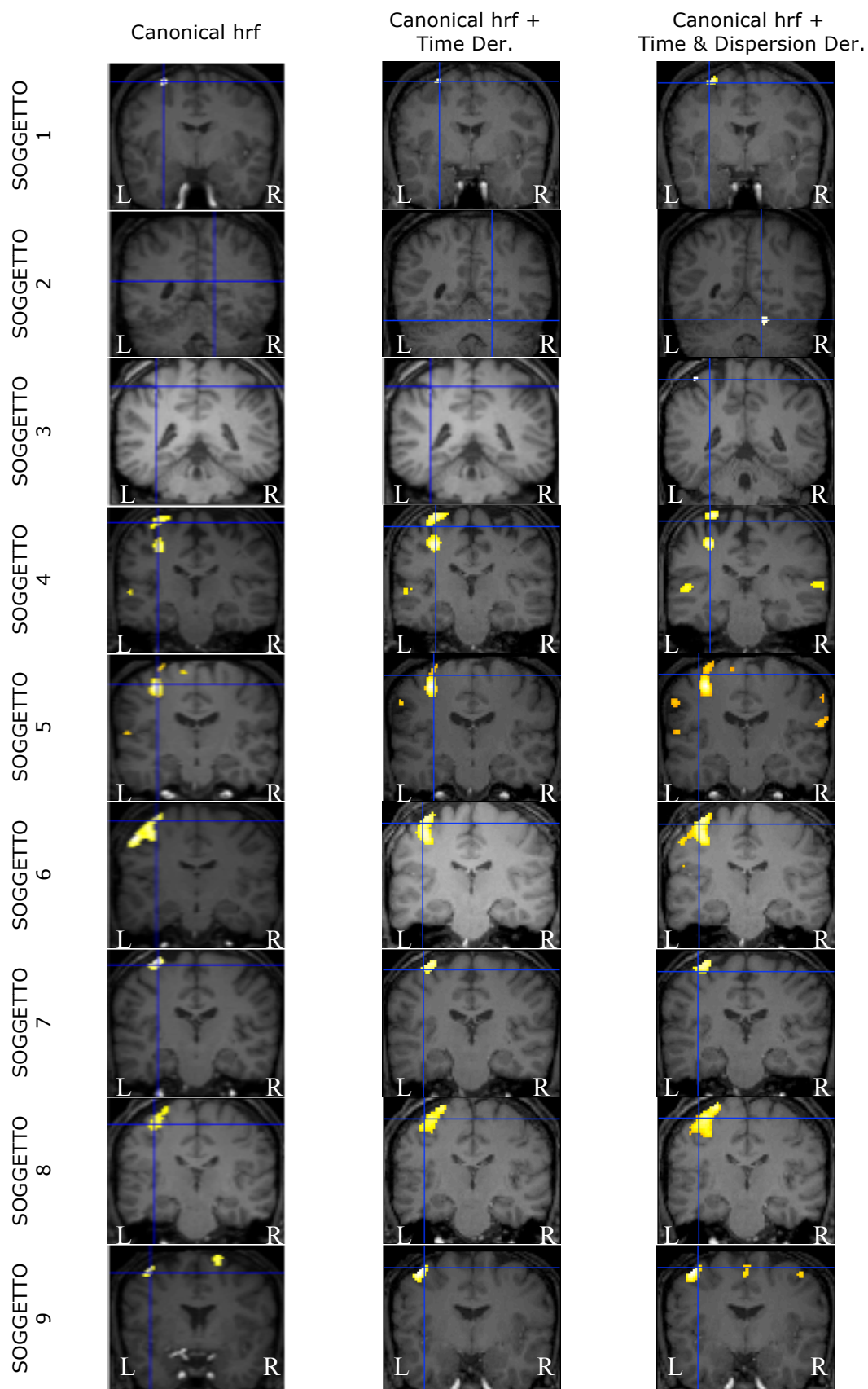


Figura 5.2: Mappe di attivazione ottenute per il movimento minimo in tutti i soggetti, in base all'hrf utilizzata: canonical hrf (prima colonna), canonical hrf + Time derivative (seconda colonna), canonical hrf + Time and Dispersion Derivatives (terza colonna). Le immagini fanno riferimento alla sezione sagittale.

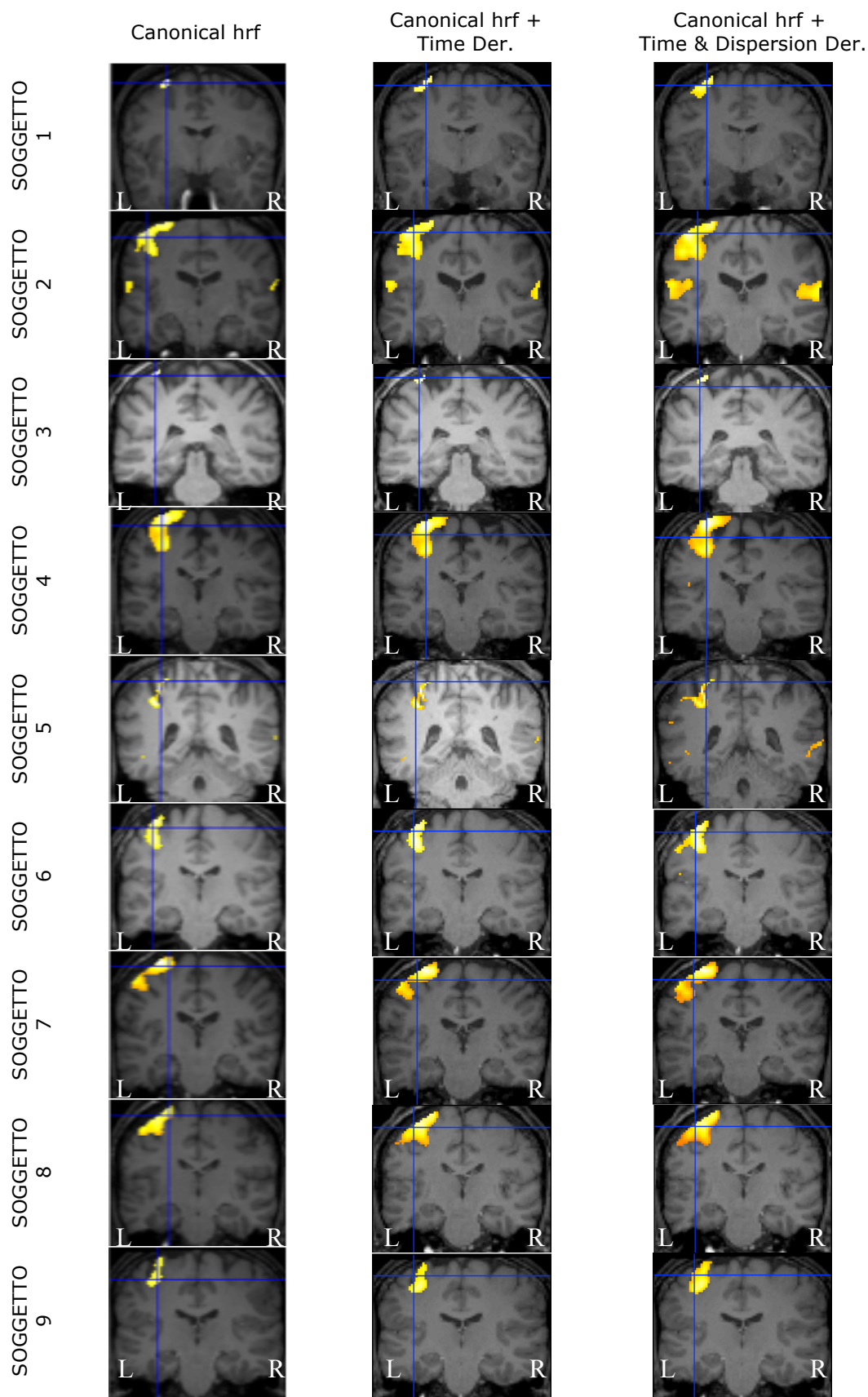


Figura 5.3: Mappe di attivazione ottenute per il movimento massimo post-sforzo in tutti i soggetti, in base all'hrf utilizzata: canonical hrf (prima colonna), canonical hrf + Time derivative (seconda colonna), canonical hrf + Time and Dispersion Derivatives (terza colonna). Le immagini fanno riferimento alla sezione sagittale.

Effettuando un'ispezione visiva delle mappe di attivazione si nota un aumento del numero di voxel attivi all'aumentare della complessità del modello utilizzato per descrivere la risposta emodinamica. Questa variazione è confermata dal calcolo del numero dei voxel attivi totali nel volume cerebrale ottenuti dal file xSPM.mat (Tabella 5.1).

In riferimento al movimento massimo si nota che utilizzando la canonical hrf solo i soggetti 4 e 5 presentano attivazione neuronale in entrambi gli emisferi cerebrali mentre gli altri soggetti presentano attivazione solo nell'emisfero sinistro, principalmente nel lobo fronto-parietale. I soggetti 1 e 8 invece presentano attivazione nell'emisfero destro solo utilizzando le componenti derivative dell'hrf. Il soggetto 4 presenta anche una mappa d'attivazione molto dispersiva rispetto agli altri soggetti ed infatti il numero di voxel attivi corrispondenti è molto elevato. Il soggetto 3 invece presenta un numero esiguo di voxel attivi utilizzando la canonical hrf e la canonical hrf+Time Derivative, rispettivamente 3 e 7 voxel).

In riferimento al movimento minimo, utilizzando la canonical hrf 7 soggetti presentano attivazione solo nell'emisfero sinistro, sempre nel lobo fronto-parietale. I soggetti 2 e 3 presentano rispettivamente un solo voxel d'attivazione nel cervelletto e zero voxel attivi utilizzando sia la canonical hrf che la canonical hrf+ Time Derivatives. Utilizzando la canonical hrf+Time and Dispersion Derivatives è presente attivazione in tutti i soggetti nell'emisfero sinistro, tranne nel soggetto 2 per il quale è presente attivazione solo nel cervelletto, ed i soggetti 4, 5 e 9 presentano attivazione anche nel lobo fronto-parietale destro.

In riferimento al movimento massimo post-sforzo utilizzando le tre hrf standard tutti i soggetti presentano attivazione nel lobo fronto-parietale sinistro ed i soggetti 2 e 5 presentano attivazione anche nel lobo fronto-parietale destro. Il numero di voxel attivi per i vari soggetti è uniforme tranne per il soggetto 3 il quale presenta un numero esiguo di voxel attivi rispetto agli altri soggetti. Il soggetto 6 presenta un numero di voxel attivi nel movimento massimo post-sforzo molto vicino al numero di voxel che si attivano nel movimento minimo.

NUMERO VOXEL ATTIVI CON HRF STANDARD									
MOVIMENTO MASSIMO			MOVIMENTO MINIMO			MOVIMENTO MASSIMO POST-SFORZO			
	Canonical hrf	Canonical hrf + Time Derivative	Canonical hrf + Time & Dispersion Derivative	Canonical hrf	Canonical hrf + Time Derivative	Canonical hrf + Time & Dispersion Derivative	Canonical hrf	Canonical hrf + Time Derivative	Canonical hrf + Time & Dispersion Derivative
SOGGETTO 1	71	88	1082	36	78	399	209	298	766
SOGGETTO 2	3207	2788	3671	1	1	32	1504	1548	3771
SOGGETTO 3	3	7	143	0	0	3	30	44	78
SOGGETTO 4	11132	11984	21942	469	651	674	1911	1958	2274
SOGGETTO 5	4437	4725	6381	877	915	2121	280	356	687
SOGGETTO 6	313	428	708	710	761	958	702	743	949
SOGGETTO 7	436	540	1088	112	155	237	1470	1634	2265
SOGGETTO 8	1244	1814	2210	580	691	1962	1646	2107	2617
SOGGETTO 9	1478	1677	3569	520	698	1163	768	1222	2182

Tabella 5.1: Numero dei voxel totali attivi nel volume cerebrale di ciascun soggetto per i movimenti massimo, minimo e massimo post-sforzo in base all'hrf standard utilizzata. Per ogni movimento nella prima sono indicati i voxel attivi ottenuti con la canonical hrf (prima colonna), canonical hrf+Time Derivative (seconda colonna), canonical hrf+Time and Dispersion Derivatives (terza colonna)

5.2 GENERAZIONE DELLA ibHRF PER OGNI SOGGETTO

Come visto nei paragrafi 2.3 e 4.2 ogni ibHRF è costruita con i parametri medi calcolati a partire dai parametri δ_1 , τ_1 , a_1 , τ_2 , a_2 , C stimati per ogni voxel d'interesse. I valori medi dei parametri stimati sono riportati in Tabella 5.2.

Parametri HRF medi							
		δ_1	τ_1	a_1	τ_2	a_2	C
S1	M	0,48	5,61	2,73	2,72	1,68	623,76
	m	1,54	3,08	5,50	13,82	0,20	686,93
	M p-S	0,25	3,57	2,65	18,00	0,17	664,47
S2	M	0,47	3,95	2,32	19,32	0,38	656,01
	m	0,00	5,15	2,20	2,86	0,67	811,68
	M p-S	1,05	3,33	4,70	15,11	0,40	689,46
S3	M	8,11	1,63	4,22	14,57	0,51	697,03
	m	/	/	/	/	/	/
	M p-S	1,48	2,51	5,69	19,54	0,42	616,44
S4	M	2,48	7,42	1,12	12,70	0,32	627,39
	m	0,33	4,61	2,21	11,04	0,25	636,42
	M p-S	0,48	4,26	1,59	18,39	0,38	664,24
S5	M	0,93	4,80	1,80	15,55	0,36	783,03
	m	1,77	4,22	2,81	11,09	0,25	777,61
	M p-S	0,26	4,43	2,14	15,65	0,36	829,98
S6	M	0,55	3,32	2,97	17,60	0,31	686,40
	m	0,57	3,31	2,46	17,04	0,20	679,24
	M p-S	0,62	3,30	2,47	17,04	0,20	677,85
S7	M	1,66	3,41	3,64	4,52	0,60	652,66
	m	0,65	4,39	2,06	9,84	0,18	638,38
	M p-S	0,67	3,94	3,41	10,99	0,20	677,45
S8	M	0,96	3,37	4,68	15,38	0,38	723,06
	m	1,55	3,51	3,68	16,24	0,25	720,69
	M p-S	0,71	3,41	3,98	13,25	0,27	719,44
S9	M	0,78	3,65	3,38	16,55	0,23	694,08
	m	2,02	3,82	1,84	16,32	0,27	721,10
	M p-S	0,60	4,38	2,19	9,78	0,36	679,76

Tabella 5.2: Parametri medi stimati per ogni soggetto a partire dalle mappe di attivazione ottenute con la canonical hrf per il movimento massimo (M), minimo (m) e massimo post-sforzo (M p-s). I parametri medi stimati sono: δ_1 , τ_1 , a_1 , τ_2 , a_2 , C .

Per ognuno dei parametri è stato calcolato il valor medio e la standard deviation (SD) per ogni soggetto.

Le ibHRF costruite per ciascun soggetto sono state confrontate graficamente con la canonical hrf di riferimento in base al movimento eseguito (Fig. 5.4, 5.5 e 5.6).

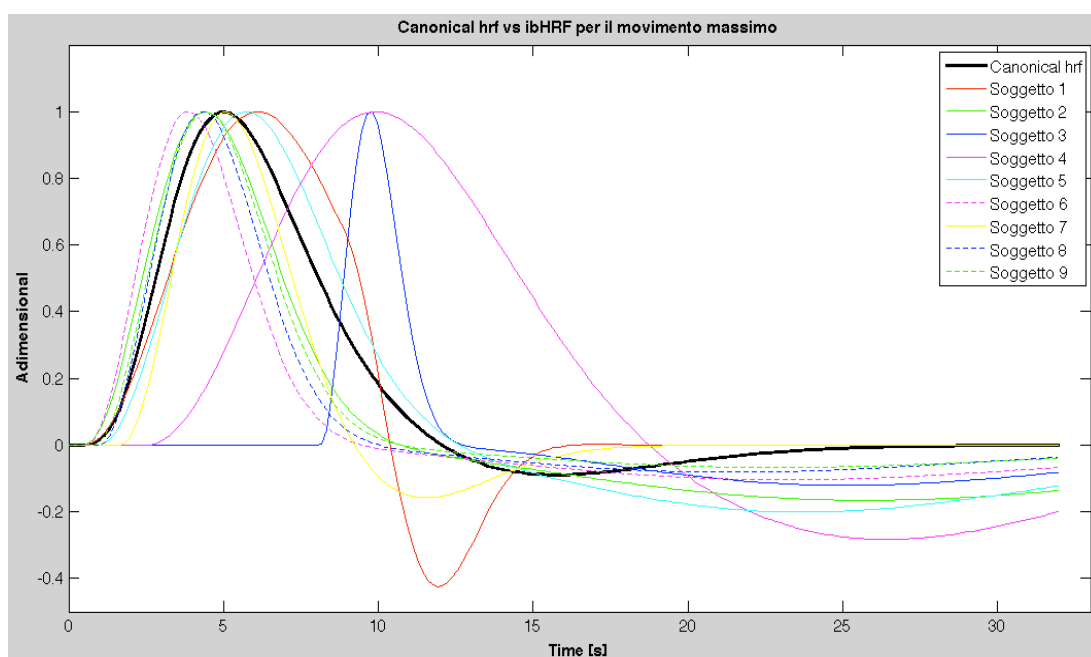


Figura 5.4: Confronto tra l'andamento della canonical hrf (nero) e l'andamento dell'ibHRF di ogni soggetto per il movimento massimo.

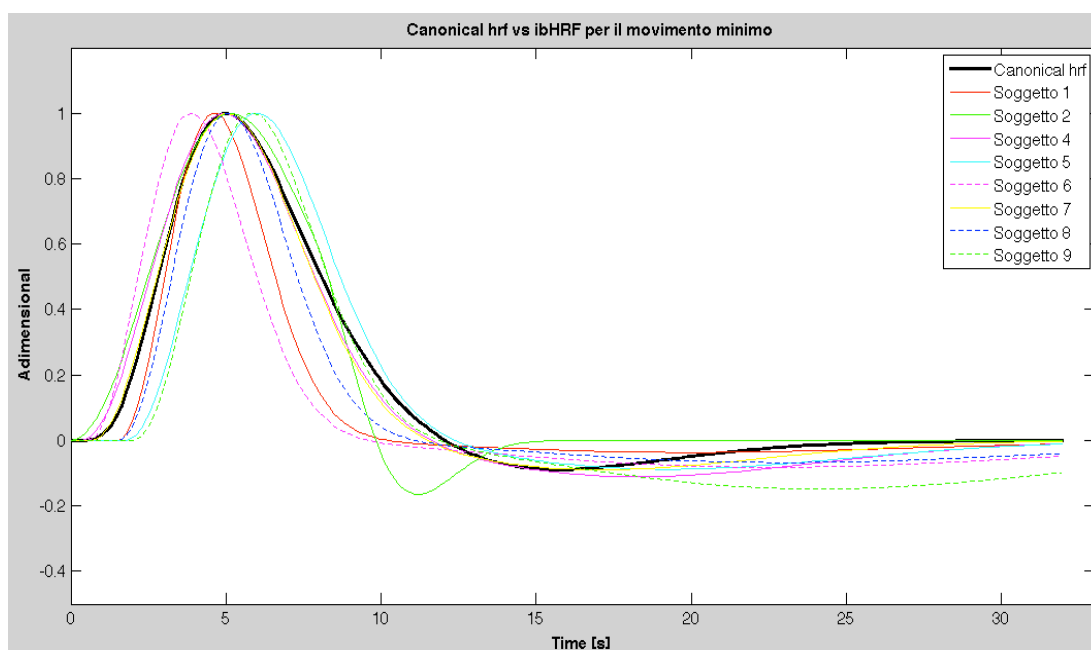


Figura 5.5: Confronto tra l'andamento della canonical hrf (nero) e l'andamento dell'ibHRF di ogni soggetto per il movimento minimo. Non è riportata l'ibHRF del soggetto 3 in quanto non è stata calcolata.

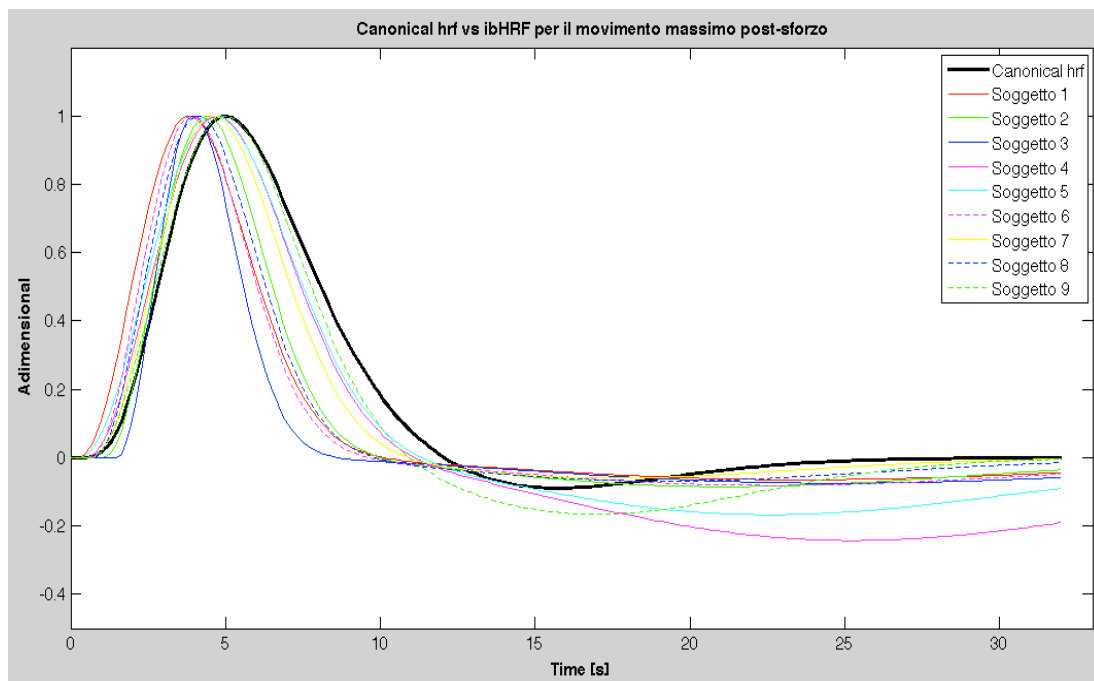


Figura 5.6: Confronto tra l'andamento della canonical hrf (nero) e l'andamento dell'ibHRF di ogni soggetto per il movimento massimo post-sforzo.

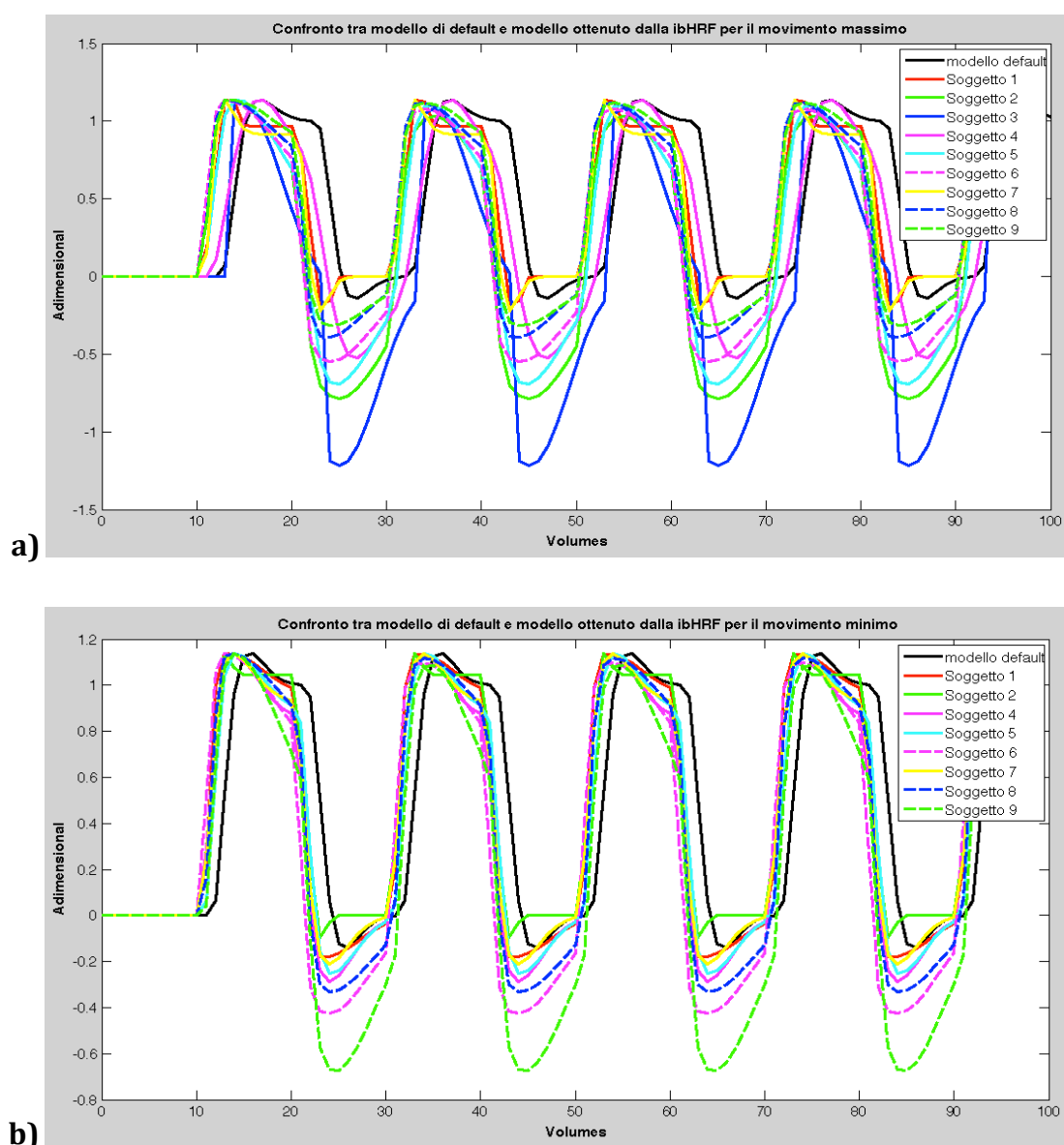
In riferimento al movimento massimo, l'ibHRF dei soggetti 1 e 7 presenta un undershoot molto breve e pronunciato mentre l'ibHRF del soggetto 3 ha una forma molto diversa da quella tipica della risposta emodinamica e presenta un picco molto ritardato. Questo sicuramente dovuto al numero esiguo di voxel attivi (3). Nel soggetto 4 l'ibHRF presenta un picco molto ritardato ed è caratterizzata da un'ampiezza di picco superiore alle altre ibHRF e un undershoot molto pronunciato. Le ibHRF dei soggetti 2, 5, 6, 8, 9 hanno forma molto vicina alla canonical hrf anche se nei soggetti 2, 6, 8, 9 il t_{peak} è inferiore rispetto alla canonical hrf. Nei soggetti 1, 3, 4, 5 il t_{peak} è superiore rispetto a quello della canonical hrf mentre nel soggetto 7 il t_{peak} è lo stesso della canonical hrf.

In riferimento al movimento minimo, l'ibHRF del soggetto 2 presenta un undershoot molto pronunciato e breve, ritornando dopo soli 15 s al valore di baseline mentre le ibHRF degli altri soggetti hanno forma molto simile alla canonical hrf ma presentano un'ampiezza di picco inferiore. In particolare le ibHRF nei soggetti 1 e 6 presentano un t_{peak} inferiore rispetto alla canonical, nei soggetti 5 e 9 un t_{peak} superiore e nei soggetti 2, 4, 7, 8 un t_{peak}

confrontabile con quello della canonical hrf. Come affermato nel paragrafo 4.2, l'ibHRF del soggetto 3 non è stata calcolata.

In riferimento al movimento massimo post-sforzo, le ibHRF hanno forma molto simile alla canonical hrf tranne nei soggetti 4 e 5 in cui presenta un undershoot molto pronunciato. Nel soggetto 9 l'ibHRF presenta lo stesso t_{peak} della canonical hrf mentre negli altri soggetti il t_{peak} risulta anticipato rispetto alla canonical hrf di riferimento.

E' stato poi confrontato il modello emodinamico costruito a partire dall'ibHRF con il modello emodinamico costruito attraverso la canonical hrf per i tre movimenti (modello default)(Fig. 5.7).



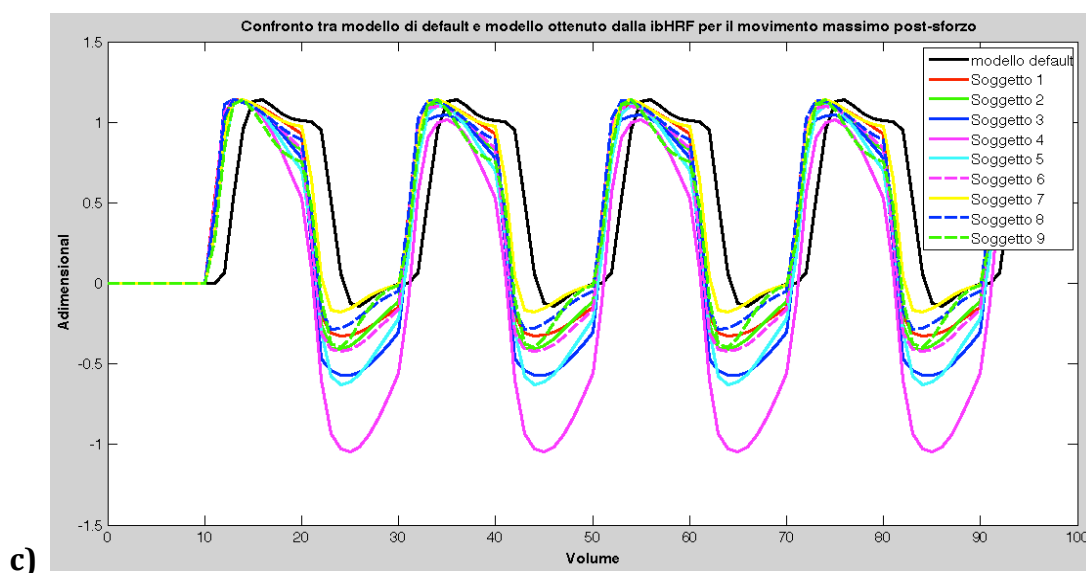


Figura 5.7: Confronto tra modello ottenuto con la canonical hrf (nero) e modello ottenuto a partire dall'ibHRF per ciascun soggetto in riferimento al movimento massimo (a), minimo (b) e massimo post-sforzo (c).

I modelli ottenuti a partire dall'ibHRF tendono ad anticipare la fase di active rispetto al modello di default per tutti e tre i movimenti e presentano un undershoot maggiore nella fase di rest. I modelli ottenuti dall'ibHRF sono molto simili tra loro nella fase active. I modelli derivanti dall'ibHRF per il movimento massimo presentano una maggiore variabilità di forma ed ampiezza. Tutti i modelli ottenuti, tranne quello del soggetto 3 per il movimento massimo, del soggetto 9 per il movimento minimo e del soggetto 4 per il movimento massimo post-sforzo, descrivono adeguatamente la latenza di picco della risposta emodinamica.

L'attivazione cerebrale derivata dall'ibHRF è stata quantificata attraverso il conteggio dei voxel totali attivi (Tabelle 5.3).

Confrontando i risultati ottenuti in tabella 5.3 con quelli riportati nella tabella 5.1, si evidenzia un aumento sostanziale del numero dei voxel attivi, anche cinquanta volte superiore, soprattutto per il movimento minimo.

Poiché l'analisi visiva delle mappe di attivazione ed il numero di voxel attivi non sono sufficienti per un confronto oggettivo della bontà del modello emodinamico, è stato calcolato l'indice di Akaike per i quattro modelli finora utilizzati.

VOXEL TOTALI ATTIVI (ibHRF)			
	MASSIMO	MINIMO	MASSIMO POST-SFORZO
SOGGETTO 1	2880	2139	1910
SOGGETTO 2	8221	241	5173
SOGGETTO 3	616	0	3972
SOGGETTO 4	15931	2528	6497
SOGGETTO 5	9147	1889	1401
SOGGETTO 6	1341	1624	1623
SOGGETTO 7	2579	1239	3217
SOGGETTO 8	5588	3873	5373
SOGGETTO 9	15794	3738	11033

Tabella 5.3: Numero di voxel attivi totali determinati utilizzando l'ibHRF per ognuno dei tre tipi di movimento (massimo, minimo, massimo post-sforzo) per ogni soggetto.

5.3 UTILIZZO DELL'INDICE DI AKAIKE PER LA SCELTA DEL MODELLO OTTIMO DELLA RISPOSTA EMODINAMICA

L'indice di Akaike è stato calcolato come l'AIC medio per ognuno dei tre movimenti in tutti i soggetti a partire dagli indici ottenuti per tutti i voxel d'attivazione della sessione esaminata (vedi paragrafo 4.6).

Gli AIC calcolati in base alla formula 4.5 sono principalmente negativi. Questo è dovuto alla funzione logaritmo che ha come argomento i residui pesati (WRSS). Poiché alcuni WRSS sono molto piccoli (prossimi allo zero) il loro logaritmo tende a $-\infty$. Questi valori così negativi influiscono in modo determinante sull'AIC finale.

In base agli indici di Akaike calcolati (Tabelle 5.4) si vede che in sei soggetti su nove per il movimento massimo, in sei soggetti su otto per il movimento minimo ed in tutti i soggetti per il movimento massimo post-sforzo, il modello dell'hrf che presenta AIC minore è quello relativo all'ibHRF. Questo ci porta a scegliere come modello ottimo per la risposta emodinamica quello relativo all'hrf individual-based. L'AIC non è stato calcolato per il movimento minimo del soggetto 2 in quanto non era possibile fare un confronto tra i quattro modelli poiché due hrf standard non fornivano attivazione cerebrale.

INDICE DI AKAIKE												
	MASSIMO				MINIMO				MASSIMO POST-SFORZO			
	Canonica l hrf	Canonical hrf + Time Derivative	Canonical hrf + Time & Dispersion Derivative	ibHRF	Canonica l hrf	Canonical hrf + Time Derivative	Canonical hrf + Time & Dispersion Derivative	ibHRF	Canonica l hrf	Canonical hrf + Time Derivative	Canonical hrf + Time & Dispersion Derivative	ibHRF
S1	48,23	32,64	15,30	-17,25	4,63	-32,54	-41,16	-65,76	3,80	-7,26	-31,65	-58,80
S2	17,79	20,18	9,81	-37,00	26,42	19,57	22,92	33,23	71,40	67,82	54,01	26,98
S3	-15,79	31,00	-8,60	4,72	/	/	/	/	105,81	102,60	95,83	-18,74
S4	-30,65	-29,78	-43,46	-41,26	-6,42	-17,28	-7,14	-48,29	8,72	0,96	-3,01	-89,95
S5	-41,05	-46,35	-50,45	-64,75	-49,36	-51,27	-47,21	-46,54	-2,06	-14,74	-22,30	-32,80
S6	8,94	-7,26	-18,49	-54,66	-26,53	-36,52	-43,75	-79,11	-26,73	-36,52	-43,96	-78,94
S7	17,71	5,45	-11,88	-27,97	-24,33	-35,30	-35,66	-68,43	-13,97	-19,66	-29,85	-52,30
S8	49,24	25,15	16,06	-25,58	15,83	8,36	8,40	-18,96	56,06	32,04	20,33	-21,40
S9	-14,58	-21,40	-38,93	-76,62	-72,03	-79,56	-67,70	-81,80	-39,45	-48,52	-60,89	-79,05

Tabella 5.4: Indice di Akaike relativo ai 3 movimenti: massimo, minimo e massimo post-sforzo per ogni soggetto in base all'hrf utilizzata per il calcolo del modello e delle mappe di attivazione. AIC relativo al modello ottenuto con la canonical hrf (prima colonna), AIC relativo al modello ottenuto con la canonical hrf più la sola derivata temporale (seconda colonna), AIC relativo al modello ottenuto con la canonical hrf più le derivate temporale e dispersiva (terza colonna), AIC relativo al modello ottenuto con l'ibHRF stimata (quarta colonna). In grassetto è evidenziato l'indice AIC minore per il soggetto.

Da una prima analisi visiva delle mappe d'attivazione cerebrale ottenute con l'hrf ottima (Fig. 5.8-5.16) è evidente un aumento dell'attivazione nell'area motoria rispetto a quelle ottenute utilizzando l'hrf peggiore (con AIC maggiore).

Nelle mappe d'attivazione ottime si evidenzia un aumento delle aree cerebrali attivate: in tutti i soggetti, tranne nel soggetto 6, è indicata l'attivazione dell'area supplementare motoria. E' presente attivazione nell'area motoria primaria controlaterale nel soggetto 1 solo per il movimento massimo, nel soggetto 2 per il movimento massimo e massimo post sforzo, nel soggetto 8 per il movimento massimo post-sforzo e nel 9 per tutti e tre i movimenti. Nel soggetto 2 l'hrf ottima fornisce solo 3 voxel d'attivazione nel cervelletto mentre utilizzando l'hrf peggiore, in questo caso l'ibHRF, si evidenzia l'attivazione dell'area motoria primaria sinistra. L'AIC è qui discordante con i risultati attesi per l'attivazione motoria ma ciò è dovuto al numero esiguo di voxel attivi per il movimento minimo nel soggetto 2. Nel soggetto 3 non sembrano esserci differenze qualitative tra l'attivazione con l'hrf ottima e con quella peggiore.

SOGGETTO 1

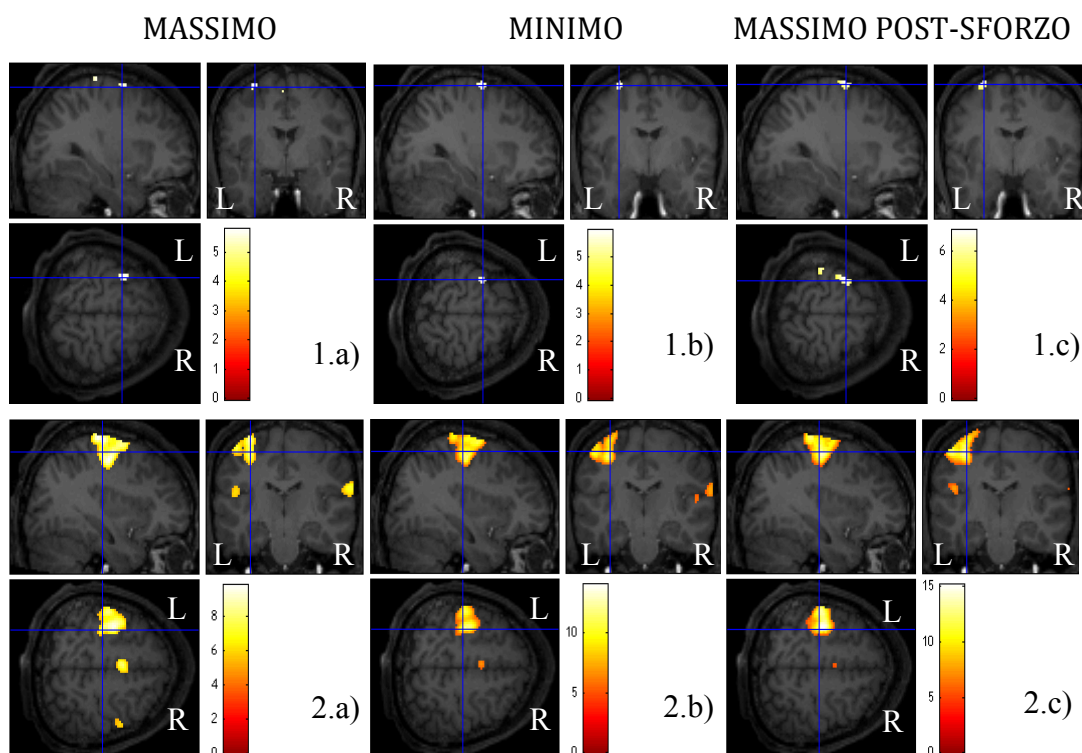


Figura 5.8: Mappe d'attivazione ottenute per il soggetto 1 con hrf peggiore (in alto, 1.a, 1.b, 1.c) e con hrf ottima (in basso, 2.a, 2.b, 2.c) per il movimento massimo (1.a e 1.b), minimo (1.b e 2.b) e massimo post sforzo(1.c e 2.c).

SOGGETTO 2

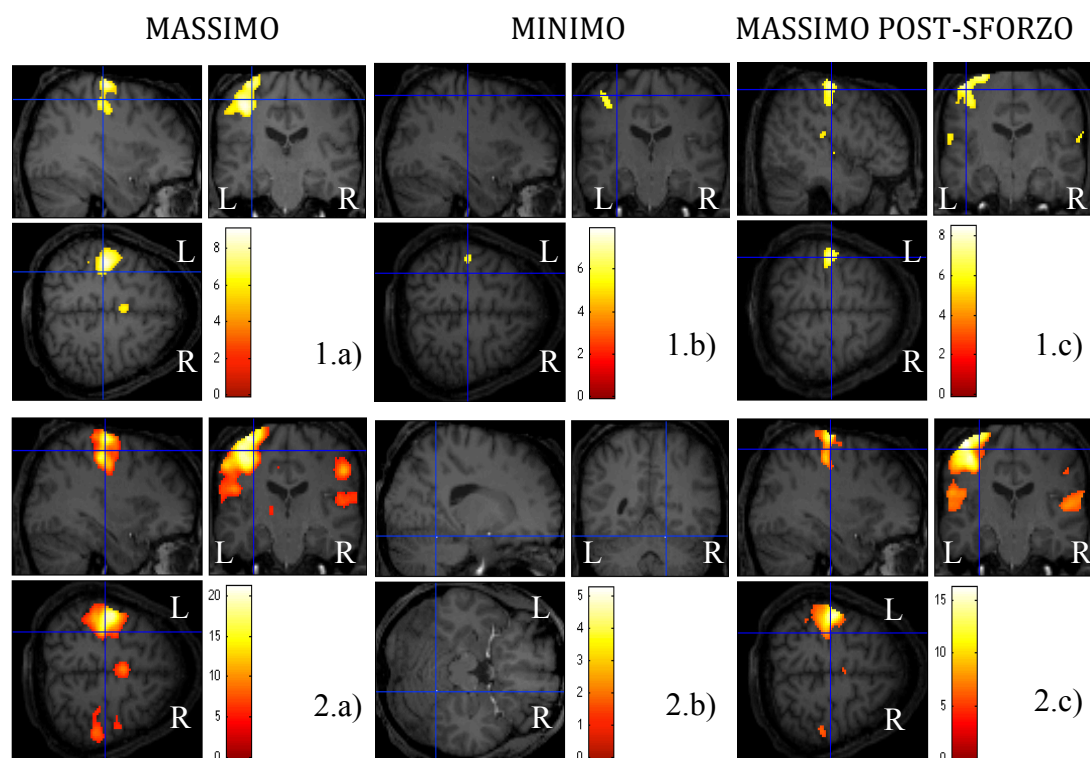


Figura 5.9: Mappe d'attivazione ottenute per il soggetto 2 con hrf peggiore (in alto, 1.a, 1.b, 1.c) e con hrf ottima (in basso, 2.a, 2.b, 2.c) per il movimento massimo (1.a e 1.b), minimo (1.b e 2.b) e massimo post sforzo(1.c e 2.c).

SOGGETTO 3

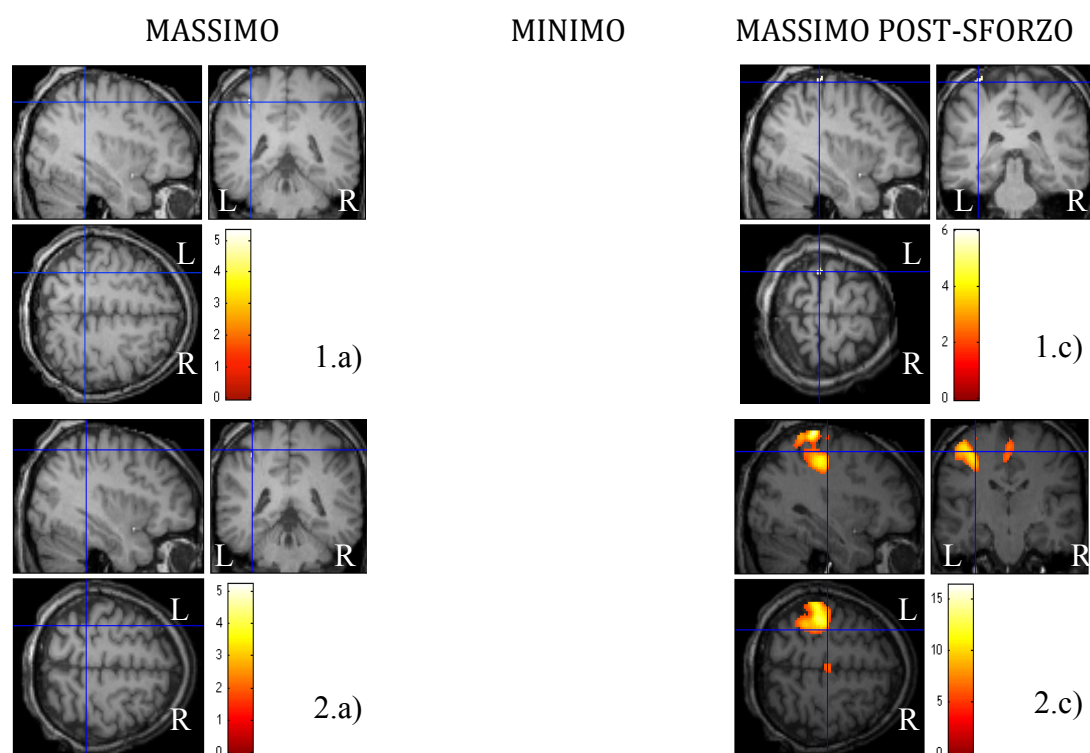


Figura 5.10: Mappe d'attivazione ottenute per il soggetto 3 con hrf peggiore (in alto, 1.a, 1.c) e con hrf ottima (in basso, 2.a, 2.c) per il movimento massimo (1.a e 1.b) e massimo post sforzo(1.c e 2.c). Per il movimento minimo non è disponibile l'AIC e quindi non è stato fatto il confronto.

SOGGETTO 4

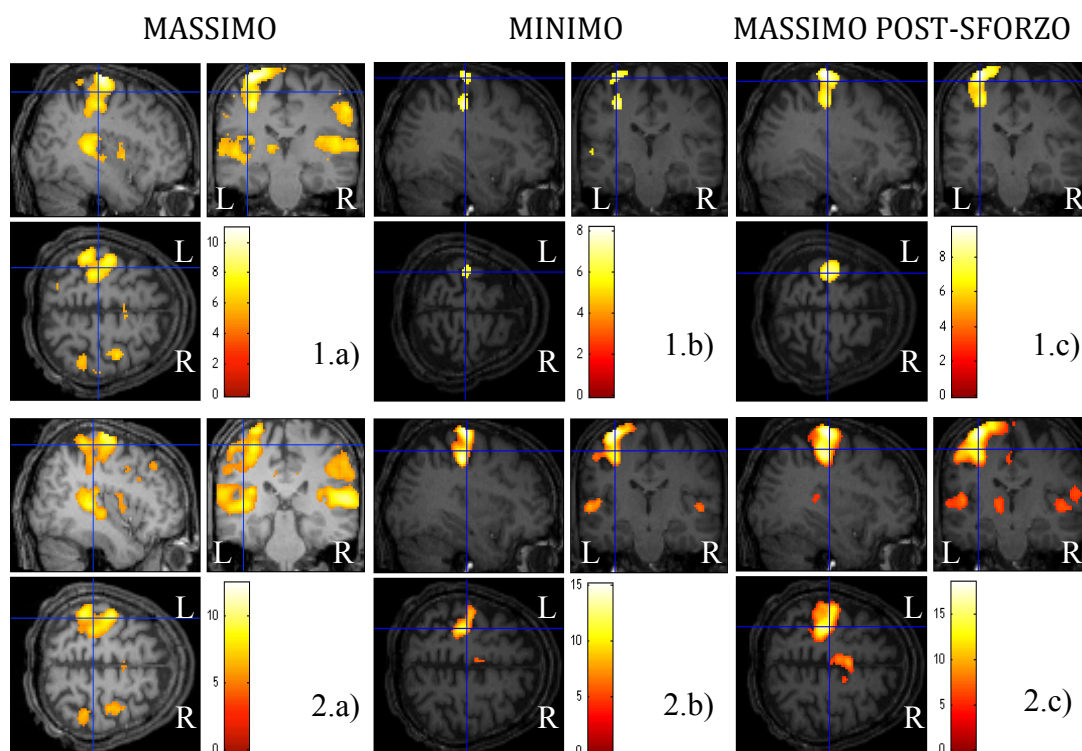


Figura 5.11: Mappe d'attivazione ottenute per il soggetto 4 con hrf peggiore (in alto, 1.a, 1.b, 1.c) e con hrf ottima (in basso, 2.a, 2.b, 2.c) per il movimento massimo (1.a e 1.b), minimo (1.b e 2.b) e massimo post sforzo(1.c e 2.c).

SOGGETTO 5

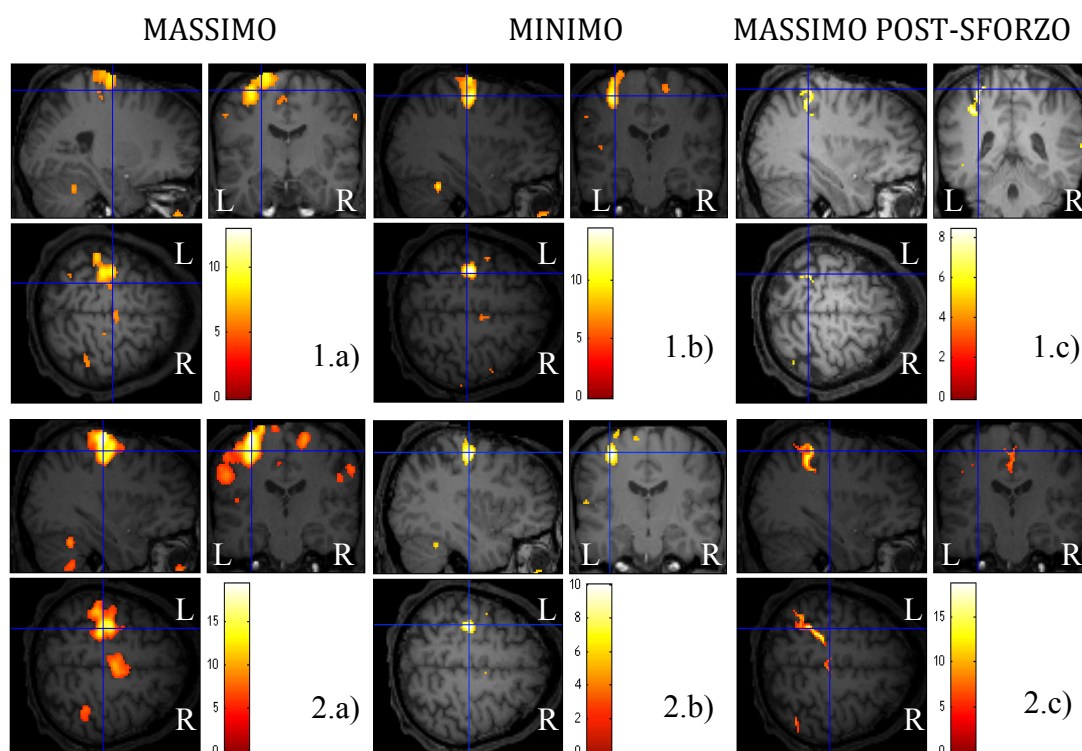


Figura 5.12: Mappe d'attivazione ottenute per il soggetto 5 con hrf peggiore (in alto, 1.a, 1.b, 1.c) e con hrf ottima (in basso, 2.a, 2.b, 2.c) per il movimento massimo (1.a e 1.b), minimo (1.b e 2.b) e massimo post sforzo(1.c e 2.c).

SOGGETTO 6

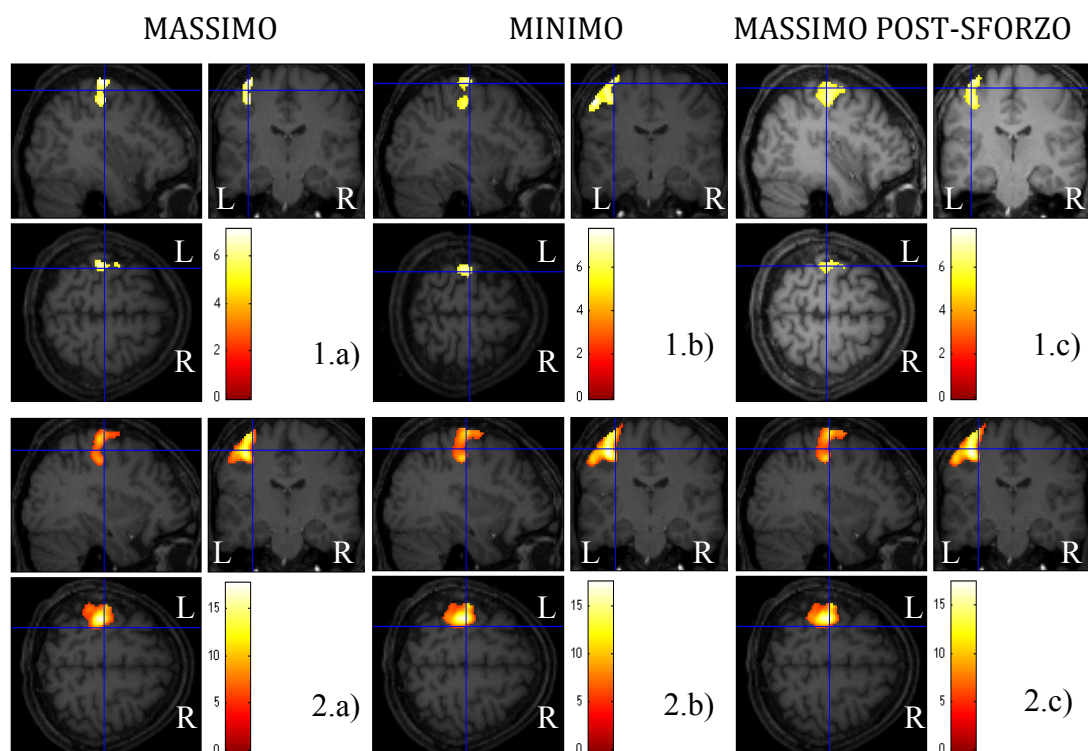


Figura 5.13: Mappe d'attivazione ottenute per il soggetto 6 con hrf peggiore (in alto, 1.a, 1.b, 1.c) e con hrf ottima (in basso, 2.a, 2.b, 2.c) per il movimento massimo (1.a e 1.b), minimo (1.b e 2.b) e massimo post sforzo(1.c e 2.c).

SOGGETTO 7

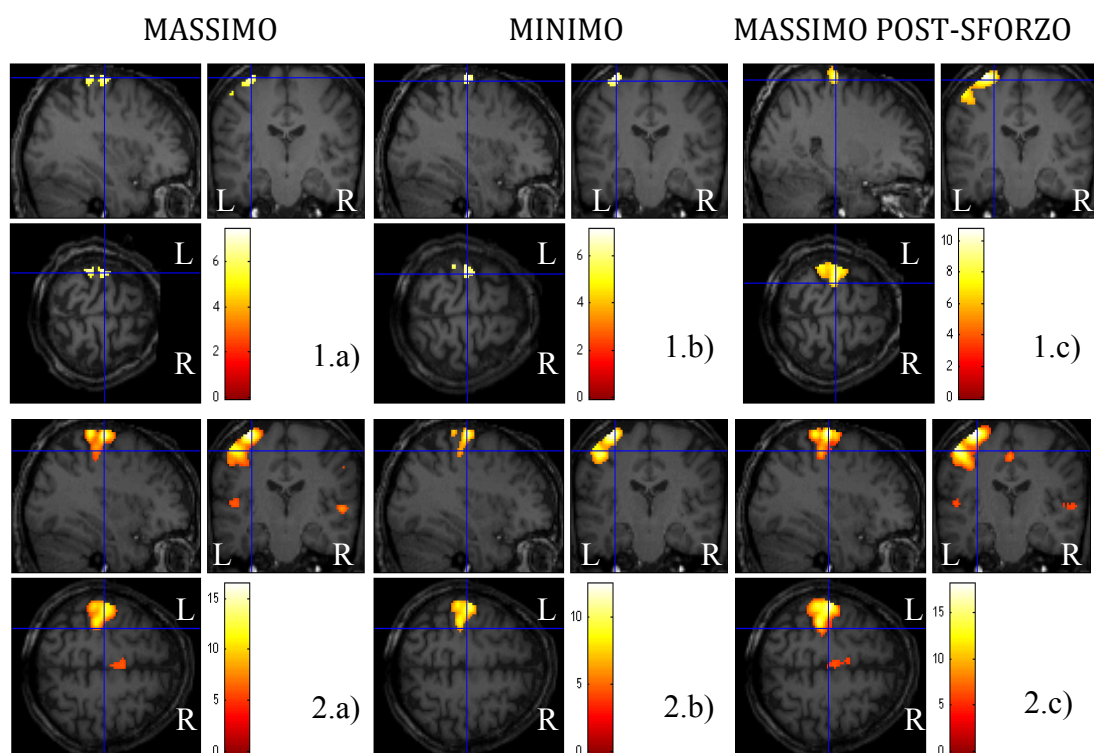


Figura 5.14: Mappe d'attivazione ottenute per il soggetto 7 con hrf peggiore (in alto, 1.a, 1.b, 1.c) e con hrf ottima (in basso, 2.a, 2.b, 2.c) per il movimento massimo (1.a e 1.b), minimo (1.b e 2.b) e massimo post sforzo(1.c e 2.c).

SOGGETTO 8

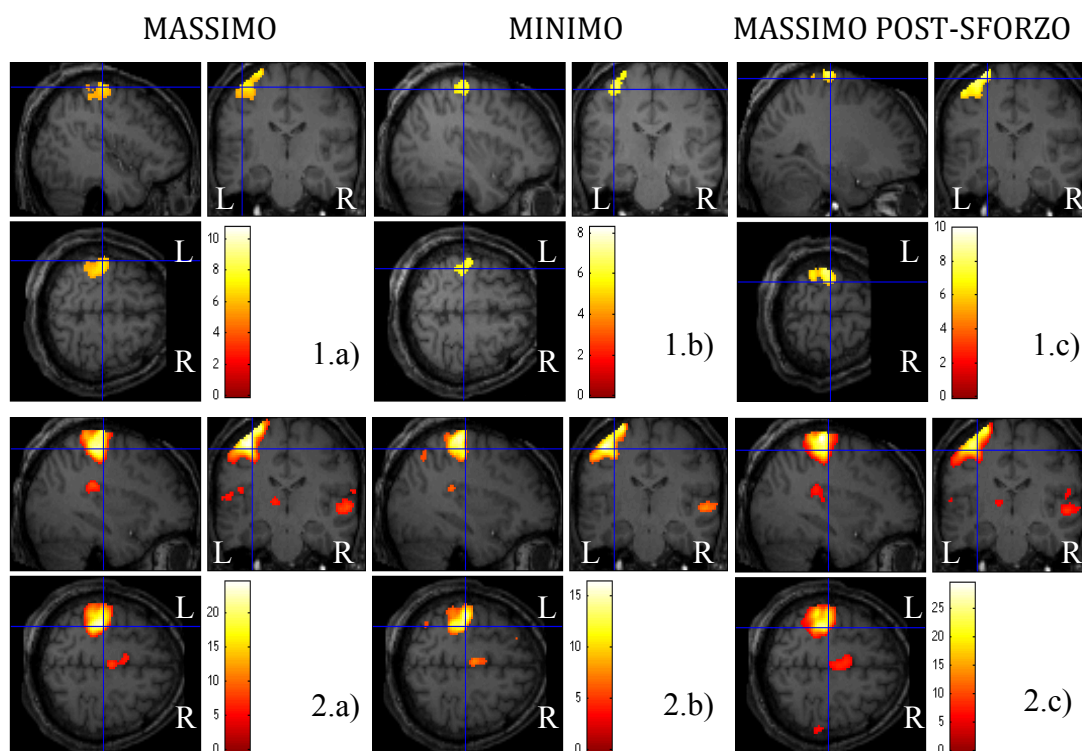


Figura 5.15: Mappe d'attivazione ottenute per il soggetto 8 con hrf peggiore (in alto, 1.a, 1.b, 1.c) e con hrf ottima (in basso, 2.a, 2.b, 2.c) per il movimento massimo (1.a e 1.b), minimo (1.b e 2.b) e massimo post sforzo(1.c e 2.c).

SOGGETTO 9

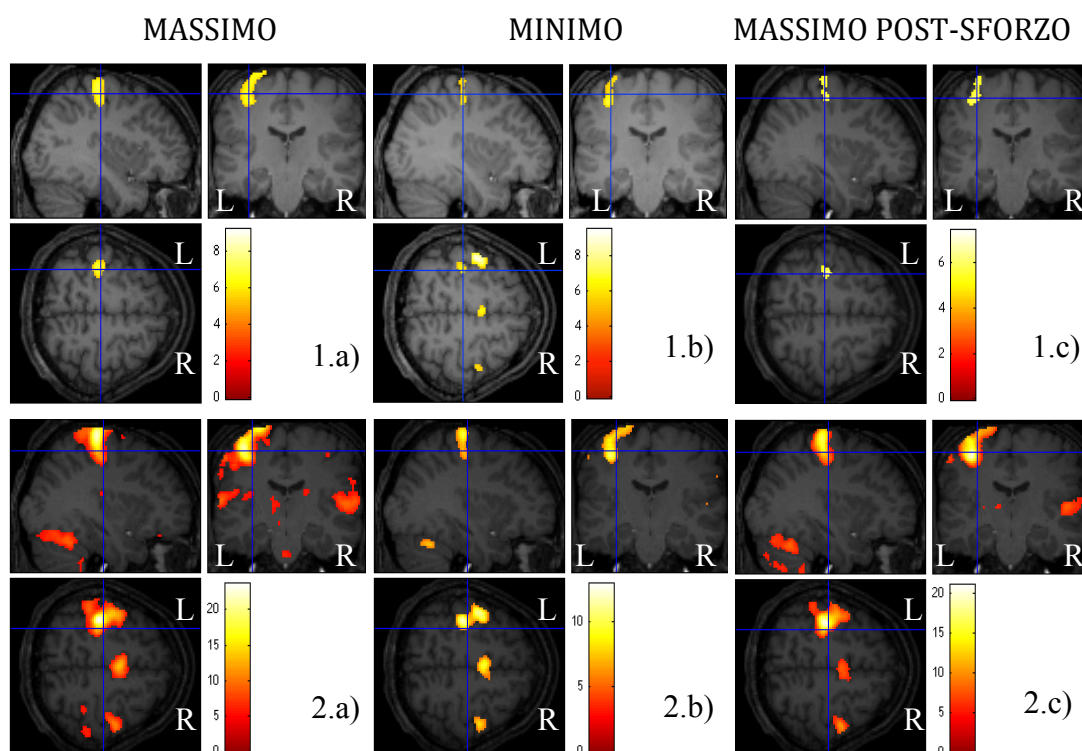


Figura 5.16: Mappe d'attivazione ottenute per il soggetto 9 con hrf peggiore (in alto, 1.a, 1.b, 1.c) e con hrf ottima (in basso, 2.a, 2.b, 2.c) per il movimento massimo (1.a e 1.b), minimo (1.b e 2.b) e massimo post sforzo(1.c e 2.c).

5.3.1 CONFRONTO TRA MOVIMENTO MASSIMO, MINIMO E MASSIMO POST-SFORZO

Sono stati confrontati i risultati ottenuti con le hrf ottime e non sulla base del tipo di movimento svolto. Una prima valutazione è stata fatta sulla base del numero di voxel attivi nel volume cerebrale calcolati a partire dalle mappe d'attivazione ottenute (Tabelle 5.1 e 5.3).

Analizzando i risultati ottenuti con l'hrf non ottima si nota in 8 soggetti su 9 una netta diminuzione del numero di voxel attivi nel movimento minimo rispetto al movimento massimo e massimo post-sforzo. Inoltre per i soggetti 2, 4, 5 e 9 si evidenzia una diminuzione dei voxel attivi nel movimento massimo post-sforzo rispetto al movimento massimo mentre per il soggetto 6 si hanno lo stesso numero di voxel attivi nel movimento minimo e massimo post-sforzo.

Utilizzando l'hrf ottima si vede una diminuzione dei voxel attivi relativi al movimento massimo post-sforzo rispetto al movimento massimo nei soggetti 1, 2, 4, 5, 8 e 9. Il soggetto 6 è l'unico per cui non è evidenziata una diminuzione del numero di voxel attivi relativi al movimento minimo rispetto al movimento massimo e presenta però lo stesso numero di voxel attivi sia nel movimento massimo post-sforzo che nel movimento minimo.

Questa diminuzione di attivazione nelle mappe relative alla sessione post-sforzo rispetto al movimento massimo è coerente con quanto riscontrato in letteratura.^{[53][54][55]}

5.4 ANALISI DELLE AREE DI ATTIVAZIONE

Per valutare le aree specifiche di attivazione si è considerata la suddivisione del volume cerebrale riportata in Fig. 5.4. Analizzando le immagini riportate nelle Fig. 5.1, 5.2 e 5.3 focalizzando l'attenzione sulle aree d'interesse, è presente in tutte le mappe attivazione dell'area motoria primaria sinistra (situata nella circonvoluzione precentrale del lobo frontale sinistro, area 4 della mappa di Brodmann)^[56], tranne in quelle relative al movimento minimo del soggetto 2 per cui non c'è attivazione e del soggetto 3 dove è presente attivazione solo nel cervelletto. L'attivazione dell'area motrice supplementare (situata nella

circonvoluzione frontale mediale, zona mediale dell'area 6 di Brodmann)^[56] è rilevata nei soggetti 1, 2, 4, 5 per il movimento massimo e nel soggetto 9 per il movimento minimo. Sono presenti aree di attivazione in corrispondenza del cervelletto (situato dorsalmente al ponte e al bulbo)^[56] in tutti i soggetti tranne nel 3 e, solo per il movimento massimo, nel 6.

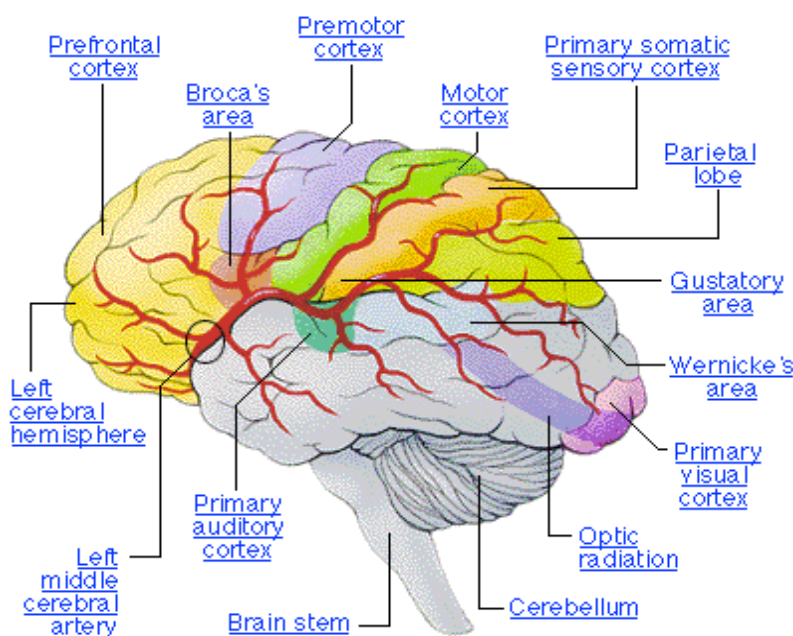


Figura 5.17: Suddivisione dell'emisfero sinistro cerebrale in aree funzionali. Le zone d'interesse sono: l'area motoria supplementare (viola, premotor cortex), la corteccia motoria primaria (verde, motor cortex), corteccia sensitiva (arancione) ed il cervelletto (grigio striato, cerebellum).^[56]

Per poter fare delle valutazioni sull'attivazione cerebrale relativa alle tre aree d'interesse relative all'ibHRF, sono stati creati i cluster contenenti i voxel attivi in queste regioni a partire dalle mappe d'attivazione (vedi paragrafo 4.5). Il numero dei voxel che formano ogni cluster è riportato nella tabella 5.5.

Per quanto riguarda l'area motoria primaria, in 4 soggetti su 9 vi è una diminuzione dell'attivazione neuronale nel movimento massimo post-sforzo rispetto al movimento massimo, in 6 soggetti su 9 ho una diminuzione dell'attivazione neurale nel movimento minimo rispetto al movimento massimo e nel soggetto 6 ho la stessa attivazione sia nel movimento minimo che nel movimento massimo post-sforzo. In base ai risultati ottenuti per l'area motoria supplementare si vede che: il soggetto 6 non presenta attivazione di quest'area per alcun movimento, in 4 soggetti su 9 vi è una diminuzione dell'attivazione nel movimento massimo post-sforzo rispetto al movimento massimo ed in 6

soggetti su 9 vi è una diminuzione dell'attivazione relativa al movimento minimo rispetto al movimento massimo.

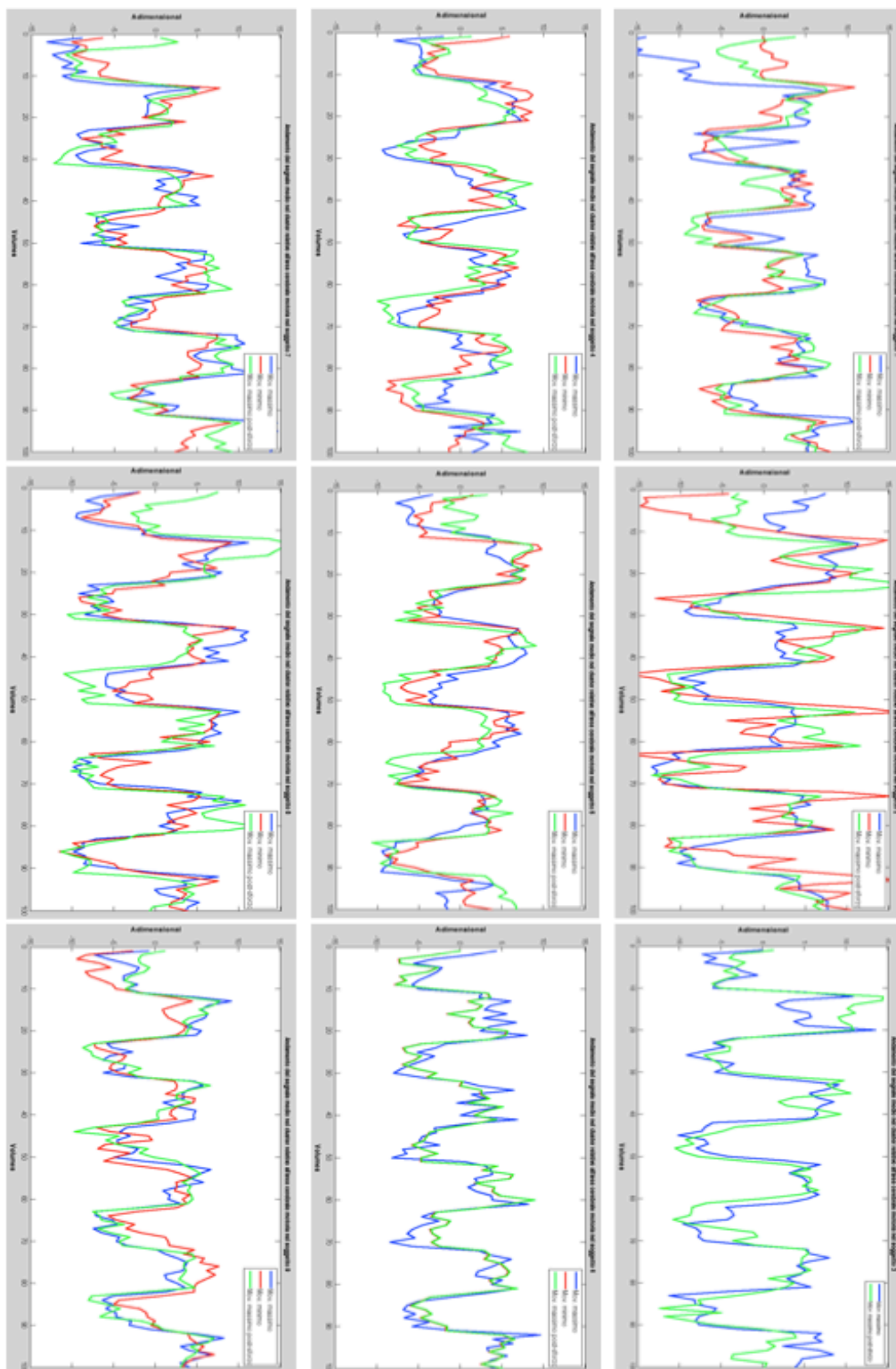
Per quanto riguarda il cervelletto si nota invece un aumento dell'attivazione in 6 soggetti su 9 nel movimento massimo post-sforzo rispetto al movimento massimo.

NUMERO VOXEL ATTIVI AREE FUNZIONALI (ibHRF)											
	AREA MOTORIA PRIMARIA			AREA MOTORIA SUPPLEMENTARE			CERVELLETTO				
	MASSIMO	MINIMO	MASSIMO POST-SFORZO	MASSIMO	MINIMO	MASSIMO POST-SFORZO	MASSIMO	MINIMO	MASSIMO POST-SFORZO		
S1	1407	1464	1578	400	60	9	67	222	145		
S2	4418	97	3550	785	0	141	1225	144	546		
S3	588	/	2556	0	/	201	4	/	640		
S4	7473	1381	3082	31	66	462	1087	138	839		
S5	3773	817	572	1073	23	223	2488	454	6		
S6	1303	1572	1570	0	0	0	38	47	48		
S7	1856	1150	2252	320	47	411	183	30	371		
S8	2488	1578	2644	189	108	328	994	544	1069		
S9	3805	1311	2320	1453	499	421	5976	988	6582		

Tabella 5.5: Numero dei voxel totali attivi per ciascun soggetto nell'area motoria primaria, motoria supplementare e nel cervelletto in base al tipo di movimento: massimo (prima colonna), minimo (seconda colonna) e massimo post-sforzo (terza colonna). Le mappe d'attivazione sono ottenute a partire dall'ibHRF.

A partire dal cluster di attivazione dell'area motoria primaria ottenuto utilizzando l'hrf ottima è stato valutato l'andamento del segnale medio in questa regione per i tre tipi di movimento in ognuno dei soggetti (Fig. 5.18) e la fitted response nel voxel di massima attivazione (Fig 5.19-21). Il segnale ottenuto segue molto bene l'andamento active-rest del protocollo sperimentale.

Figura 5.18: Andamento medio del segnale nell'area motoria primaria per il movimento massimo (blu), minimo (rosso) e massimo post-sforzo (verde) in ogni soggetto.



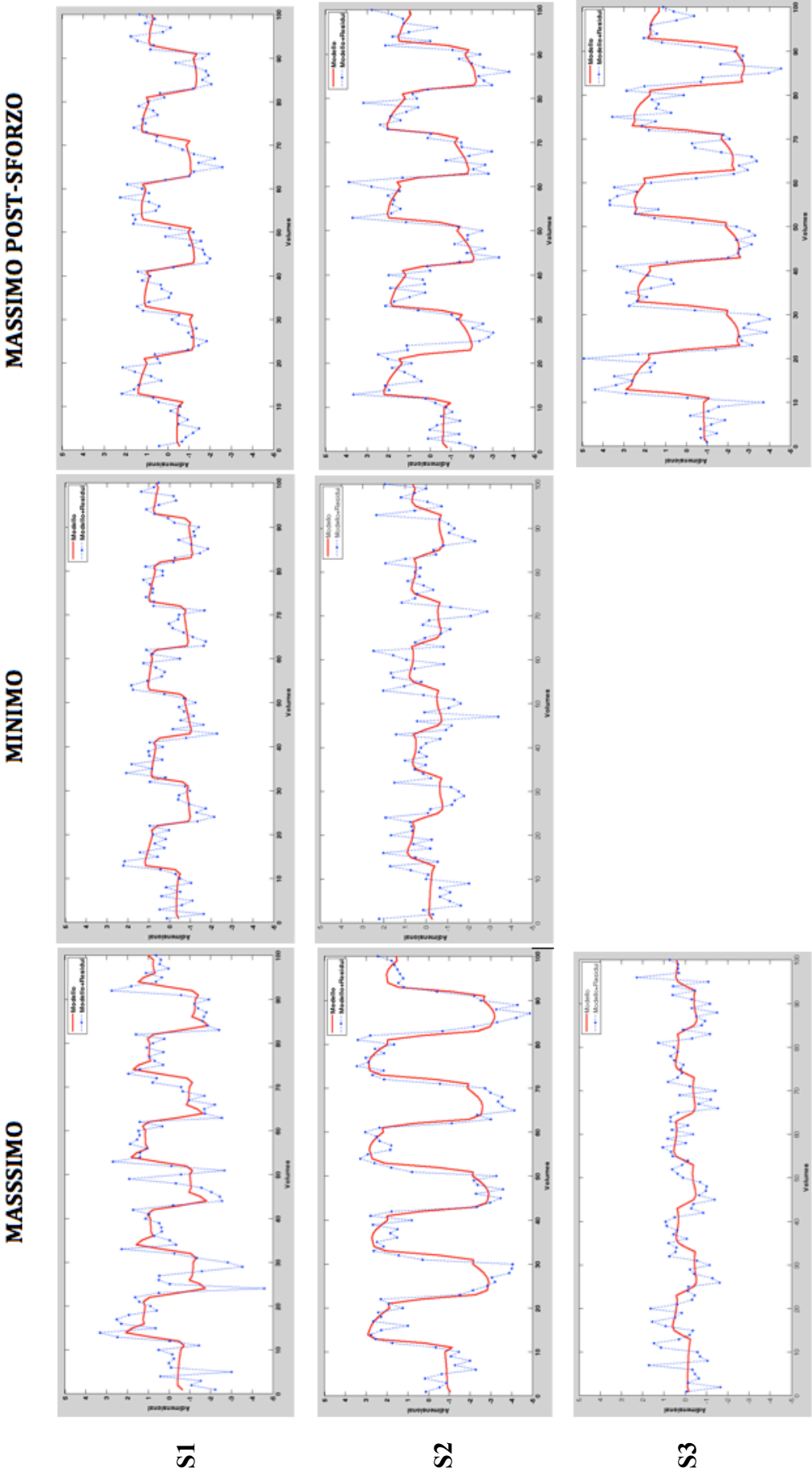


Figura 5.19: Fitted response (rosso) e residui (blu) calcolati nel voxel di massima attivazione del cluster relativo all'area motoria primaria dei soggetti 1, 2, 3 per ciascun movimento

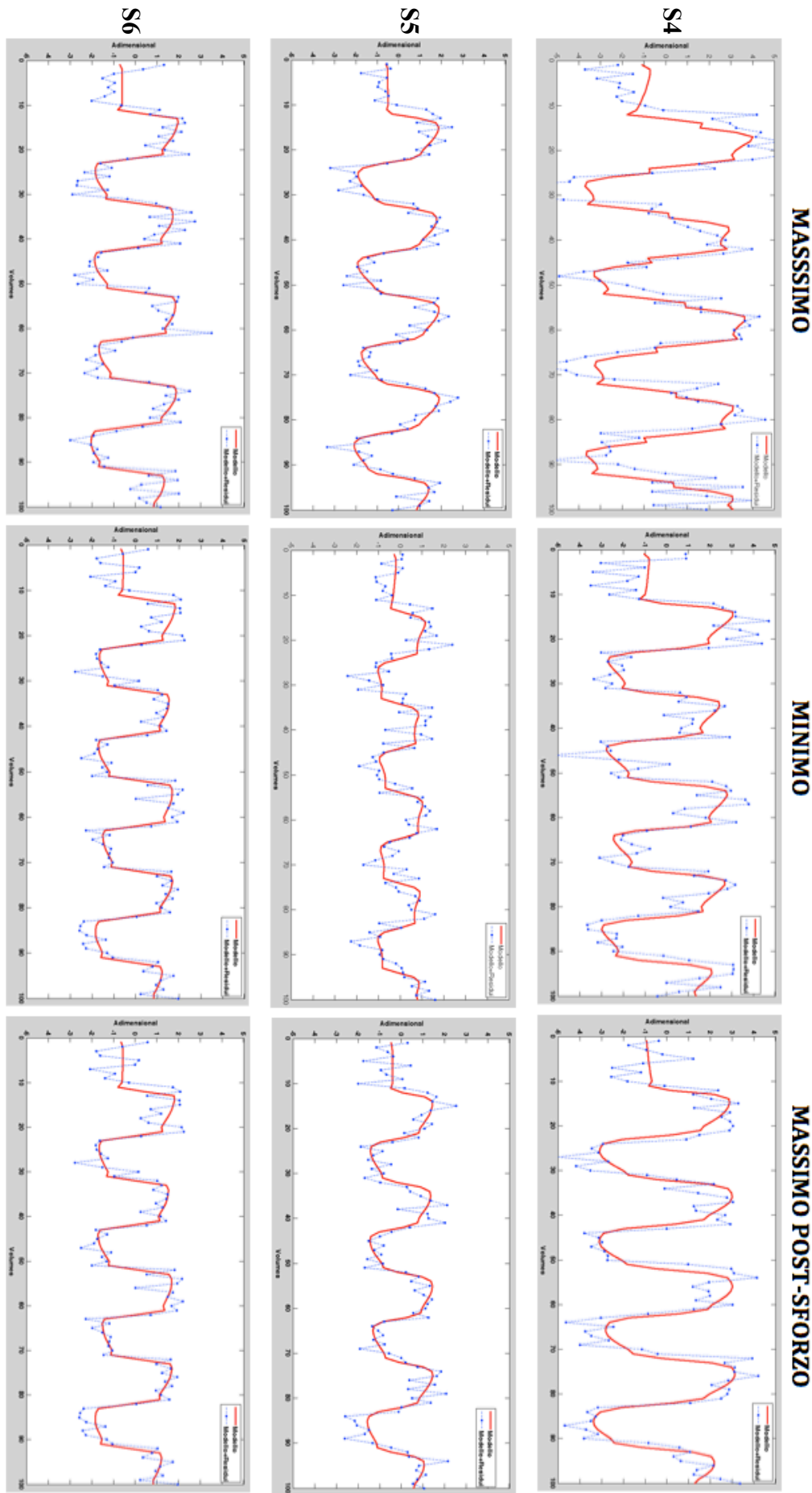


Figura 5.20: Fitted response (rosso) e residui (blu) calcolati nel voxel di massima attivazione del cluster relativo all'area motoria primaria dei soggetti 4, 5, 6 per ciascun movimento

MASSIMO POST-SFORZO

MINIMO

MASSIMO

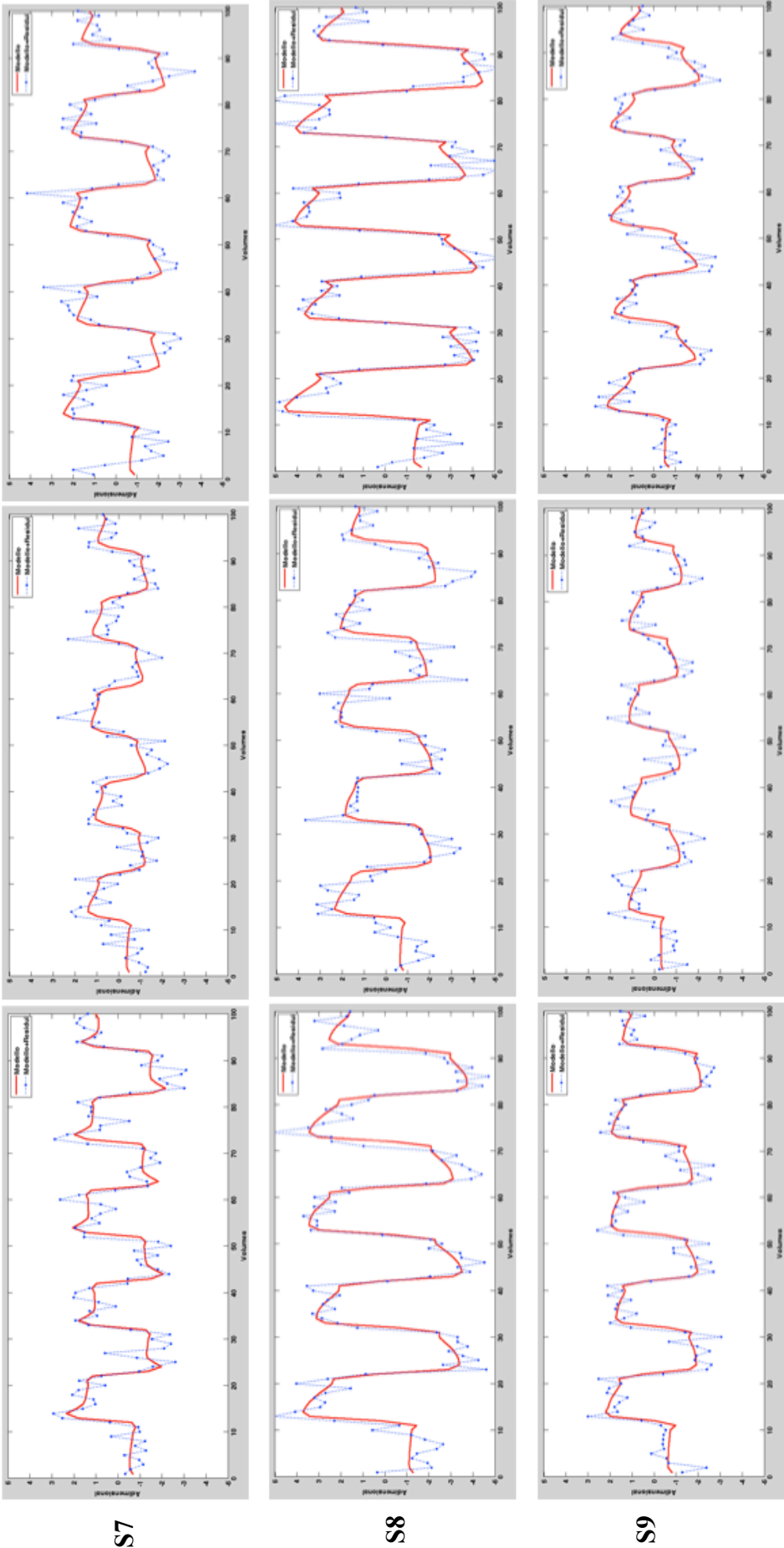


Figura 5.21: Fitted response (rosso) e residui (blu) calcolati nel voxel di massima attivazione del cluster relativo all'area motoria primaria dei soggetti 7, 8, 9 per ciascun movimento

Da una considerazione visiva, le risposte predette all'interno dell'area motoria primaria utilizzando l'hrf ottima si vede che i residui sono scorrelati e non sono presenti zone di accumulo.

5.5 ANALISI DI GRUPPO

Una prima analisi di gruppo è stata effettuata per ognuno dei tre movimenti utilizzando il random effect (vedi paragrafo 4.7) inserendo le immagini di contrasto ottenute con l'impiego dell'hrf ottima per ogni soggetto (Fig. 5.23). Le mappe d'attivazione sono ottenute senza applicare alcuna correzione ($p < 0.001$) in quanto la correzione FWE rate è troppo restrittiva per questa analisi.

Dall'analisi visiva delle mappe d'attivazione ottenute dall'analisi di gruppo, in riferimento al movimento massimo, si vede che l'attivazione nell'area motoria primaria e nel cervelletto è molto estesa e marcata ed è presente attivazione dell'area motoria supplementare. E' inoltre rilevata un'attivazione nell'area motoria controlaterale sinistra.

Per il movimento minimo si nota una riduzione dell'attivazione nell'area motoria primaria e nel cervelletto rispetto al movimento massimo mentre non è presente attivazione nell'area motoria supplementare.

Relativamente al movimento massimo post-sforzo è evidente una netta diminuzione dell'attivazione cerebrale nelle tre aree d'interesse rispetto al movimento massimo.

E' stata fatta una valutazione oggettiva sulla base del numero dei voxel attivi nell'intero volume cerebrale e nelle aree d'interesse (Tabella 5.6). E' evidente una netta riduzione del numero totale di voxel attivi nel movimento massimo post-sforzo rispetto al movimento massimo. Si nota inoltre una netta riduzione del numero di voxel attivi sia nel cluster motorio che nel cervelletto, nel movimento massimo post-sforzo rispetto al movimento massimo. Inoltre il numero di voxel attivi nel cluster motorio per il movimento massimo post-sforzo è molto simile a quello relativo al movimento minimo.

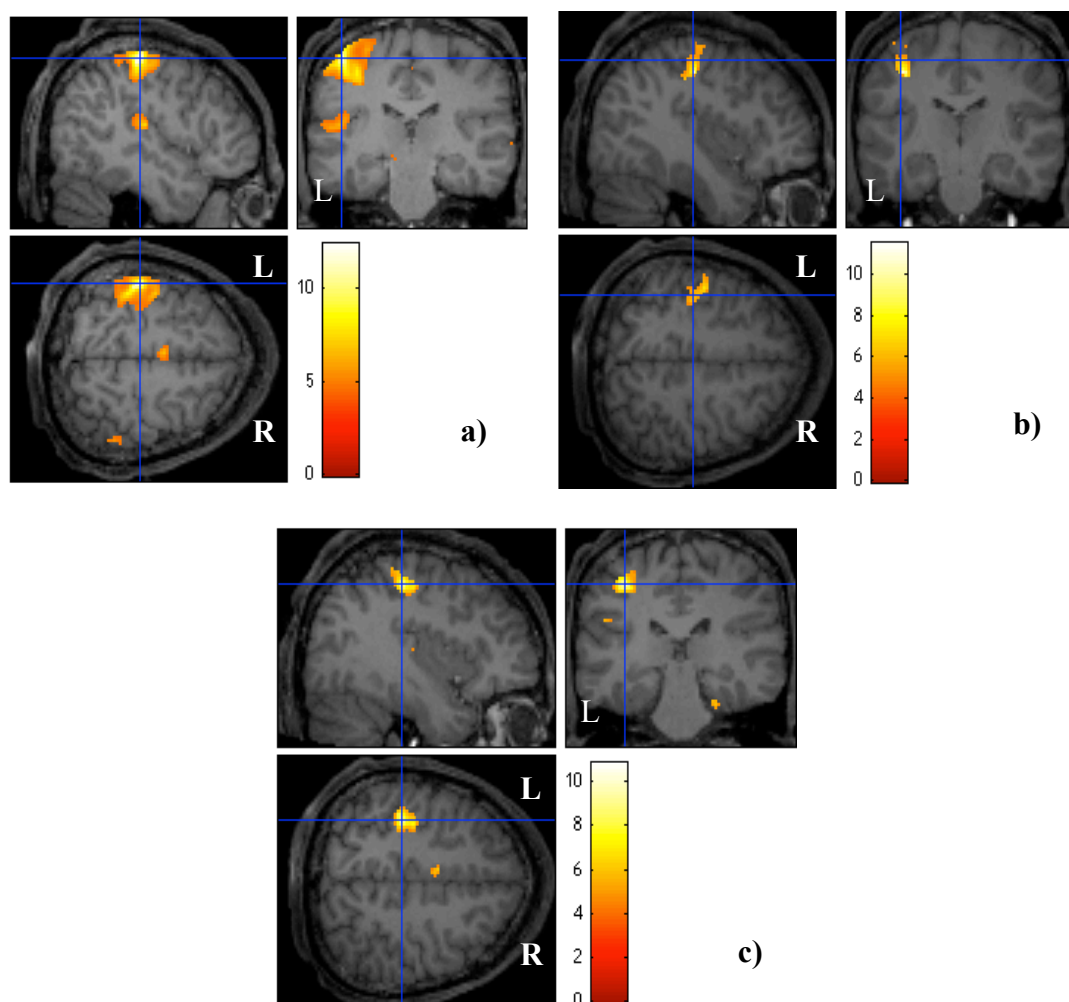


Figura 5.23: Mappa d'attivazione ottenuta dall'analisi di gruppo per il movimento massimo (a), minimo (b) e massimo post-sforzo (c) sovrapposte all'immagine anatomica del soggetto 1 (b) per ottenere una miglior localizzazione spaziale cerebrale.

	MASSIMO	MINIMO	MASSIMO POST-SFORZO
Volume cerebrale	3005	689	560
Area motoria primaria	1607	242	258
Area motoria supplementare	822	447	46
Cervelletto	151	0	19

Tabella 5.6: Analisi di gruppo. Numero di voxel attivi nell'intero volume cerebrale e nelle tre aree d'interesse per ognuno dei tre tipi di movimento (massimo, minimo, massimo post-sforzo).

Infine è stata svolta un'analisi di gruppo per evidenziare le differenze tra movimento massimo e massimo post-sforzo. La mappa d'attivazione ottenuta utilizzando la correzione FWE rate ($p < 0.05$) non presenta voxel d'attivazione.

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI

La risonanza magnetica funzionale è una tecnica non invasiva che ha ampia applicazione sia nella valutazione di anomalie funzionali cerebrali in persone affette da neuropatologie sia nello studio dei meccanismi neuronali alla base del funzionamento del sistema nervoso centrale in soggetti sani. Essendo il segnale fMRI strettamente legato alle variazioni dell'emodinamica cerebrale, i risultati ottenuti, ossia le attivazioni funzionali, dipendono fortemente dal modello della risposta emodinamica utilizzato per l'elaborazione.

Lo scopo della presente ricerca era quello di individuare le differenze di attivazione neuronale corticale in soggetti sani in base alla hrf utilizzata, standard o individual-based, ed al tipo di task motorio svolto, prensione eseguita con la mano destra con flessione delle dita massima, minima e massima dopo affaticamento.

E' risaputo che la canonical hrf fornisce una descrizione sufficientemente buona della reale risposta emodinamica per la maggior parte dei soggetti nelle regioni cerebrali corticali e subcorticali. Attraverso l'utilizzo della canonical hrf si ottengono informazioni solo sulla localizzazione dell'attivazione cerebrale più intensa. Per ottenere una mappa di attivazione più completa e informazioni sulla varianza delle caratteristiche principali della risposta emodinamica (onset, undershoot, FWHM, etc.) è necessario implementare il modello attraverso l'introduzione delle componenti derivative temporale e dispersiva.^{[57][58]} I risultati ottenuti dal nostro studio evidenziano un aumento dell'attivazione neuronale all'aumentare delle componenti derivative considerate in aggiunta al modello della canonical hrf in termini sia di estensione che di voxel attivi.

Molti studi riportati in letteratura hanno dimostrato che la risposta emodinamica varia a seconda delle aree cerebrali (Schacter et al. 1997, Logothetis & Wandell 2004,^{[22][59]} e da soggetto a soggetto (Aguirre et al. 1998, Neumann et al. 2003).^{[23][60]} Per questo motivo si è deciso di costruire una hrf individual-based per

ogni soggetto e ciascun compito motorio, ibHRF, e confrontare le quattro risposte emodinamiche prese in esame in termini di modello e mappe d'attivazione.

L'ibHRF utilizzata per questo studio (Storti et al. 2009) permette di utilizzare un modello che è più complesso rispetto alla canonical hrf, presentando maggiori gradi di libertà, ed allo stesso tempo parsimonioso, in quanto definito a partire dalla stima di soli 6 parametri. I risultati ottenuti con l'ibHRF evidenziano una maggior attivazione corticale sia nell'area motoria primaria che in altre aree cerebrali: area supplementare motoria, area motoria primaria contro-laterale e cervelletto.

Le aree d'attivazione individuate in questo studio sono in concordanza con dati della letteratura che descrivono il comportamento cerebrale in risposta a movimenti di flessione delle dita della mano (prensione). In base all'homunculus motorius (Fig. 6.1) si può notare la corrispondenza tra l'attivazione presente nell'area motoria primaria nelle mappe cerebrali ottenute e la collocazione dell'area relativa alla mano nella M1.

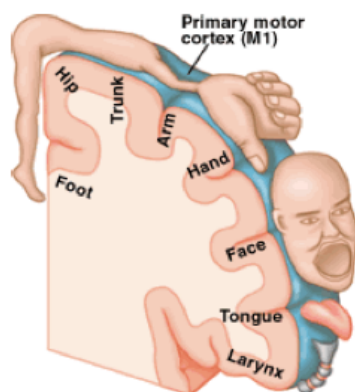


Figura 6. 1: Somatotopia dell'area motoria primaria.[56]

Il cervelletto invece svolge un ruolo importante nella regolazione delle funzioni motorie soprattutto nella coordinazione dei compiti motori. Esso infatti svolge una funzione mediatrice tra i segnali provenienti dal sistema nervoso periferico e quelli provenienti dalle strutture cerebrali (corteccia motoria e pre-motoria) andando a correggere il movimento durante l'esecuzione.

La scelta del modello ottimo tra i quattro utilizzati in questo studio è stata eseguita attraverso l'indice di Akaike andando a quantificare la bontà del modello. In base all'AIC il modello ottimo della risposta emodinamica cerebrale è risultato essere l'ibHRF in 7 soggetti su nove per i movimenti massimo e minimo e in tutti i soggetti per il movimento massimo post-sforzo. Questo

risultato è in accordo con la stessa definizione di ibHRF: essa infatti mira a descrivere in modo ottimale la variabilità intra-soggetto della risposta emodinamica rispetto ad una hrf standard.

Il riconoscimento dell'ibHRF come modello ottimo in questo studio ha permesso di fornire un ulteriore dominio di validità (gesto motorio) per l'applicazione del modello ibHRF già impiegato in precedenza nello studio di pazienti affetti da stroke (Storti et al. 2009).

Oltre alle variazioni dell'attivazione neuronale in base alla risposta emodinamica, sono state valutate le variazioni in base al gesto motorio preso in esame. In letteratura è riportato che, in studi fMRI relativi all'attivazione corticale, in soggetti sani a seguito di un task motorio della mano dopo un esercizio a fatica, è presente una riduzione significativa del numero di voxel attivi nell'intero volume cerebrale, in particolare nell'area motoria primaria e supplementare.^{[53][54][55][61][62]}

I risultati individuali descrivono la diminuzione dell'attivazione cerebrale globale mentre non evidenziano in modo netto la diminuzione dell'attivazione neuronale nell'area motoria in corrispondenza del movimento massimo post-sforzo rispetto al movimento massimo. L'analisi di gruppo conferma invece i dati riportati in letteratura evidenziando una diminuzione consistente, dell'ordine anche di centinaia di voxel, dell'attivazione neuronale sia nell'intero volume cerebrale sia nelle tre aree d'interesse analizzate.

La diminuzione dell'attivazione cerebrale a seguito dell'esercizio a fatica della mano è stata interpretata in questo studio come una conseguenza quantitativa dell'insorgenza della fatica centrale anche nei soggetti sani, e non solo neuropatologici. La diminuzione dell'attivazione è quindi dovuta all'effetto inibitorio che si verifica a causa di meccanismi che agiscono a livello globale sull'insieme delle funzioni nervose del SNC.

Questo studio si presenta come un primo approccio alla valutazione della fatica centrale in soggetti sani attraverso uno studio fMRI con l'utilizzo di una risposta emodinamica cerebrale individual-based. I risultati ottenuti possono essere considerati come riferimento per studi relativi alla fatica centrale su soggetti neuropatologici che non presentano alterazioni sostanziali del controllo motorio della mano. Inoltre suggerisce una nuova possibile interpretazione

sull'insorgenza della fatica in pazienti affetti da neuropatologie che potrebbe essere dovuta non ad un affaticamento a livello neuro-muscolare ma ad un'azione preventiva messa in atto dal sistema nervoso centrale.

In futuro sarebbe utile applicare il modello ibHRF ad altri studi per fornire ulteriori domini di validità al modello implementato, andando a studiare la variabilità della risposta emodinamica nelle diverse regioni cerebrali.

Bibliografia e Sitografia

1. Valli, G, Coppini, G, "*Bioimmagini*", Collana di Ingegneria Biomedica, Pàtron Editore, Bologna, 8:224-226, 2002.
2. <http://www.laboratorium.dist.unige.it>
3. Strangman, G, Culver, JP, Thompson, JH, Boas, DA, "*A Quantitative Comparison of Simultaneous BOLD fMRI and NIRS Recordings during Functional Brain Activation*", *NeuroImage* 17, 719–731, 2002.
4. Ogawa, S, Lee, TM, Kay, AR, Tank, DW, "*Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation*", *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9868–9872, 1990.
5. Kwong, KK, Belliveau, JW, Chesler, DA, Goldberg, IE, Weisskoff, RM, Poncelet, BP, Kennedy, DN, Hoppel, BE, Cohen, MS, Turner, R, "*Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation*", *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 5675-5679, 1992.
6. Turner, R, Le Bihan, D, Moonen, CT, Despres, D, Frank, J, "*Echo-planar time course MRI of cat brain oxygenation changes*". *Magn Reson Med*, 22: 159-66, 1991.
7. Pauling, L, Coryell, C, "*The magnetic properties and structure of hemoglobin, oxyhemoglobin and carbonmonoxyhemoglobin*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 22: 210–216, 1936.
8. Appunti lezione corso di Neuroingegneria, Prof.ssa A. Bertoldo, anno 2009/2010.
9. Small, SA, "*Quantifying cerebral blood flow: regional regulation with global implications*". *J. Clin. Invest.* 114: 1046–1048, 2004.
10. Huettel, SA, Song, AW, McCarthy, G, "*Functional magnetic Resonance Imaging*", Huettel, 2004.

11. Bisciotti, GN, Iodice, PP, Massarelli, R, "*La fatica: aspetti centrali e periferici*", SdS Anno XXI, 54: 28-41, 2002.
12. Guézennec CY, "*La fatigue centrale: électrophysiologique ou neurochimique*". Science & Sport. 15: 228-233, 2000.
13. Davis, MP, Walsh, D, "*Mechanism of fatigue*". The journal of Supportive Oncology, Vol.8, Nember 4, 2010.
14. Chaudhuri, A, O Behan, P, "*Fatigue in Neurological disorders*". The Lancet, 363: 978-988, March 2004.
15. Filippi, M, Bozzali, M, Rovaris, M, "*Evidence for Widesprid axonal damage at the eri est clinical stage of Multiple Sclerosis*". Brain, 126: 433-37, 2003.
16. White, A, Lee, J, Light, A, Light, K, "*Brain activation in multiple sclerosis: a BOLD fMRI study of the effects of fatiguing hand exercise*". Mult Scler.,2009;
17. Filippi, M, Rocca, MA, Colombo, B, "*Functional magnetic resonance imaging correlates of fatigue in multiple sclerosis*". NeuroImage, 15: 559–67, 2002.
18. Jokobi, JM, Killinger, DW, Wolfe, BM, Mahon, JL, Rice, CL., "*Quadriceps muscle function and fatigue in women with Addison's disease*". Muscle Nerve, 24: 1040–49, 2001.
19. Merkies, ISJ, Schwartz, PIM, Samiju, JPA, van der Mehe, FGA, van Doorn, PA., "*Fatigue in immune mediated polyneuropathies*". Neurology, 53: 1648–54, 1999.
20. De Lange, FP, Kalkman, JS, Bleijenberg, G, "*Neural correlates of the chronic fatigue syndrome – an fMRI study*". Brain, 127, 1948–1957, 2004.
21. Buchwald, D, Herrell, R, Ashton, S, et al., "*A twin study of chronic fatigue*". Psychosom Med, 63: 936–43, 2001.
22. Schacter, DL, Buckner, RL, Koutstaal, W, "*Late onset of anterior prefrontal activity during true and false recognition: an event-related fMRI study*". NeuroImage 6: 259–69, 1997.

23. Aguirre, GK, Zarahn, E, D'Esposito, M, "*The variability of human, BOLD hemodynamic responses*". *NeuroImage* 8: 360–69, 1998.
24. Penny, WD, Friston, KJ, Ashburner, JT, Kiebel, SJ, Nichols, TE, "*Statistical Parametric Mapping: The Analysis of Functional Brain Images*", Academic Press, 178-192 140-147 101-105 118-125 59-61 156-165, 2004.
25. http://radiopaedia.org/articles/bold_imaging
26. Boynton, GM, Engel, SA, Glover, GH, "*Linear systems analysis of functional magnetic resonance imaging in human V1*". *J Neurosci* 16: 4207–21, 1996.
27. Lindquist, MA, Loh, J, Atlas, L, Wager, TD, "*Modeling the hemodynamic response function in fmri: Efficiency, bias and mis-modeling*". *NeuroImage*, 45: 187-198, 2008.
28. <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm8/>
29. Handwerker, DA, Ollinger, JM, D'Esposito, M, "*Variation of BOLD hemodynamic responses across subjects and brain regions and their effects on statistical analyses*". *NeuroImage* 21: 1639-1651, 2004.
30. Aguirre, GK, Zarahn, E, D'Esposito, M, "*The variability of human, BOLD hemodynamic responses*". *Neuroimage* 8 (4): 360–369, 1998.
31. Zarahn, E, "*Using larger dimensional signal subspaces to increase sensitivity in fMRI time series analyses*". *Hum. Brain Mapp.* 17 (1): 13–16, 2002.
32. Riera, JJ, Watanabe, J, Kazuki, I, Naoki, M, Aubert, E, Ozaki, T, et al., "*A state- space model of the hemodynamic approach: nonlinear filtering of BOLD signals*". *Neuroimage* 21 (2): 547–567, 2004.
33. Liao, C.H., Worsley, K.J., Poline, J.B., Aston, J.A., Duncan, G.H., Evans, A.C., "*Estimating the delay of the fMRI response*". *Neuroimage* 16: 593–606, 2002.

34. Petersson, KM, Nichols, TE, Poline, JB, Holmes, AP, "*Statistical limitations in functional neuroimaging.I. Non-inferential methods and statistical models*". Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 354: 1239-1260, 1999.
35. Friston, KJ, Holmes, AP, Worsley, KJ, Poline, JB, Firth, CD, Frackowiak; RSJ, "*Statistical Parametric Maps in Functional Imaging: A General Linear Approach*". Human Brain Mapping, 2: 189-210, 1995.
36. www.support.brainvoyager.com
37. Jezzard, P, Matthews, PM, Smith, SM, "*Functional MRI: an introduction to methods*". Oxford University Press, 252-253, 2003.
38. Benjamini, Y, Braun, H, "*John W. Tukey's contribution to multiple comparison*". The Annual of Statistics, 30: 1576-1594, 2002.
39. Nichols, T, Hayasaka, S, "*Controlling the familywise error rate in functional neuroimaging: a comparative review*". Statistical Methods in Medical Research, 12: 419-446, 2003.
40. Pastore, M, Nucci, M, Galfano, G, "*False discovery rate: applicazione di un metodo alternativo per i confronti multipli con misure ripetute*".
41. Brett, M, Penny, W, Kiebel, S, "*An introduction to Random Field Theory*". Human Brain Mapping, 44: 867-879.
42. www.medical.siemens.com
43. Amaro, E Jr, Barker, GJ, "*Study design in fMRI: Basic principles*". Brain Cogn 60:220-232, 2006.
44. <http://fmri.mchmi.com>
45. Ashburner, J, Barnes, G, Chen, CC, et al., "*SPM8 Manual*", 2010.
46. Allen, JS, Damasio, H, Grabowski, TJ, "*Normal neuroanatomical variation in the human brain: An MRI-volumetric study.*". Am J Phys Anthropol 118 (4): 341-58, 2002.
47. <http://www.fmrib.ox.ac.uk>

48. <http://psyphz.psych.wisc.edu/~oakes/spm>
49. Storti, SF, Formaggio, E, Bertoldo, A, Sartori, E, Manganotti, P, Fiaschi, A, Toffolo, GM, *"Selection of Optimal Hemodynamic Response Function for fMRI Analysis on Acute Stroke Patients"*. O. Dossel and W.C. Shlegel (Eds.): WC 2009, IFMBE Proceedings, 25/IV: 253-256, 2009.
50. Burnham, KP, Anderson, DR, *"Model Selection and Multimodel Inference. A Pratical Information-Theoretic Approach"*. Springer, Second Edition, pag. 49-67, 2002.
51. Turkheimer, FE, Hinz, R, Cunningham, VJ, *"On the undecidability among kinetic models: from model selection to model averaging"*. J Cereb Blood Flow Metab, 23:490–498, 2003.
52. Friston, KJ, Holmes, AP, Price, CJ, Buchel, C, Worsley, KJ, *"Multisubject fMRI studies and conjunction analyses"*. NeuroImage 10, 385-396, 1999.
53. Benwell, NM, Byrnes, ML, Mastaglia, FL, Thickbroom, GW, *"Primary sensomotor cortex activation with task-performance after fatiguing han exercis"*. Exp. Brain Res, 167: 160-164, 2005.
54. Benwell, NM, Mastaglia, FL, Thickbroom, GW, *"Reduced functional activation after fatiguing exercise is not confined to prymary motor areas"*. Exp. Brain Res, 175: 575-583, 2006
55. Liu, JZ, Zhang, L, Yao, B, Sahgal, V, Yue, GH, *"Fatigue induced by intermittent maximal voluntary contractions is associated with significant losses in muscle output but limited reductions in functional MRI-measured brain activation level"*, Brain Res., 1040: 44, 2005.
56. Mazzocchi, G, Nussdorfer, G, *"Anatomia funzionale del sistema nervoso"*, Ed. Libreria Cortina, pag. 206-207, 2003.
57. Della-Maggiore, V, Chau, W, Peres-Neto, PR, McIntosh, AR., *"An empirical comparison of SPM preprocessing parameters to the analysis of fMRI data"*. NeuroImage. 17: 19-28, 2002.
58. Miezin, FM, Maccotta, L, Ollinger, JM, Petersen, SE, Buckner, RL, *"Characterizing the hemodynamic response: Effects of presentation*

- rate, sampling procedure, and the possibility of ordering brain activity based on relative timing "*. NeuroImage, 11: 735-759, 2000.
59. Logothetis, NK, Wandell, BA, *"Interpreting the BOLD signal"*. Annual Review of Physiology, 66: 735-69, 2004.
60. Neumann, J, Lohmann, G, Zysset, S, von Cramon, DY, *"Within-subject variability of BOLD response dynamics,"*. NeuroImage ,19: 784-796, 2003.
61. Benwell, NM, Mastaglia, FL, Thickbroom, GW, *"Changes in the functional MR signal in motor e non-motor areas during intermittent fatiguing hand exercise"*. Exp. Brain Res., 182: 93-97, 2007.
62. Rupp, T, Perrey, S, *"Prefrontal cortex oxygenation and neuromuscular responses to exhaustive exercise"*. Eur. J. Appl. Physiol., 102: 153-163, 2008.

*“... quando davanti a te si apriranno tante strade e non saprai quale prendere,
non imboccarne una a caso, ma siediti e aspetta.*

Respira... Aspetta e aspetta ancora.

Stai ferma, in silenzio, e ascolta il tuo cuore.

Quando poi ti parla, alzati e vai dove lui ti porta.”

